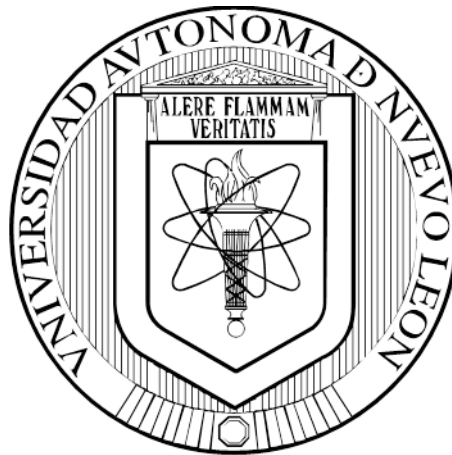


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



“Evaluación de la eficiencia del péptido RVG29m como vehículo para la entrega del gen CDFN en un modelo animal de la enfermedad de Parkinson”

POR

L.B.G. DANIEL MATTA YEE CHIG

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN MORFOLOGÍA

OCTUBRE, 2017

"Evaluación de la eficiencia del péptido RVG29m como vehículo para la entrega del gen CDFN en un modelo animal de la enfermedad de Parkinson."

Aprobación de tesis:



Dra. Odila Saucedo Cárdenas
Director



Dra. Aracely García García
Co-Director



Dr. Humberto Rodríguez Rocha
Comisión de tesis



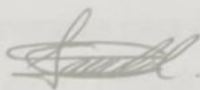
Dr. Med. Felipe Arturo Morales Martínez
Subdirección de Estudios de Posgrado

"Evaluación de la eficiencia del péptido RVG29m como vehículo para la entrega del gen CDNF en un modelo animal de la enfermedad de Parkinson"

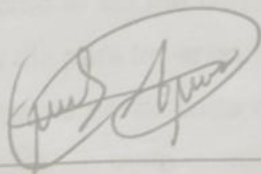
Presentado por

L.B.G. Daniel Matta Yee Chig

El presente trabajo fue elaborado en el departamento de Histología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección de la Dra. Odila Saucedo Cárdenas y la co-dirección de la Dra. Aracely García García.



Dra. Odila Saucedo Cárdenas
Director



Dra. Aracely García García
Co-Director

" En la obra de la vida, no hay papeles malos solo actores mediocres "

Anónimo

Dedicatoria

Para las personas que siempre han creído en mí inclusive cuando yo he dudado de mis capacidades, ellos que me guiaron en todo el camino y siempre me dieron su apoyo incondicional.

A mi Familia:

Para las personas que guardo en mi corazón que fueron a apartar un lugar en el cielo para nosotros y que desde lo lejos nos cuidan, mis abuelitos Aurora León, Martha Granados y Norberto Matta Gracias con todo mi amor.

Para mí abuelito Gilberto Yee Chig por ser el pilar de la familia, por hacer la comida china más rica de todo el mundo y por todo el tiempo que me brinda para dar me consejos con todo mi amor.

A mis familiares mi tío Alfredo, Andrés, Ulises y a mi tía Angelica por todos los consejos brindados, mi tía Norma, Nelly, mi tío Jorge, Eliot por su apoyo y a todos aquellos que participaron directa o indirectamente en la elaboración de esta tesis.

Para Daniel Matta y María del Carmen Yee Chig mis padres que sin ellos no sería la persona en la que me he convertido, a ellos les debo todas mis metas, gracias por brindarme las herramientas necesarias para salir adelante. Para Maylee Matta, Iván Valdez e Ivanna Valdez por el apoyo recibido, las alegrías que día a día recibo de ustedes, con todo mi amor y dedicación.

Al amor de mi vida:

Por ayudar a quitarme el sueño en las noches por culpa del café, ese de tus ojos dulces y esa sonrisa radiante como el sol me conquistó. Estefanía Ramírez, por ti es porque decido ser mejor cada día para tener un mejor futuro. Por toda la felicidad y grandes emociones que me haces sentir cada día y por compartir tantos años juntos en un camino que nos apasiona tanto como la ciencia. P.D. ¡Te amo hasta el fin!

Agradecimientos

A Dios por haberme permitido llegar hasta este punto y haberme dado salud para lograr mis objetivos, además de su infinita bondad y amor.

Quiero agradecer a mi familia enormemente la paciencia de escuchar me, para guiarme, aconsejarme y apoyar me para la realización de este proyecto, ustedes siempre han sido mi fuente de inspiración los amo y no cambiaría por nada la gran familia que tengo. A mis primos Andrea, Andrés, Aydee, César, Denisse, Diana, Héctor, Iveth, Javeira, Martha, Mayela, Sofia y Xiao por la gracia de crecer a su lado y estar siempre unidos. Mi sobrina Ivanna por el tiempo que me permitió para terminar de escribir y por animar me con sus travesuras para terminar la tesis.

A la familia Ramírez Ávila por recibirme en su casa para lograr terminar trabajos y ayudar de forma directa o indirecta a la realización del proyecto.

Agradezco a la Dra. Odila Saucedo, por haberme guiado y brindando enseñanzas durante mi formación, por su increíble paciencia y dedicación.

Al Dr. Roberto Montes por su atención, amabilidad, consejos y estar al pendiente de las necesidades para la realización del proyecto.

A mi comisión de tesis, la Dra. Aracely García y el Dr. Humberto Rodríguez por asesorar me en las diversas situaciones y quedarse tarde para la revisión del proyecto. A la Dra. María de Jesús Loera, Dr. Arnulfo Villanueva, Dra. Laura Zavala, Dr. Adolfo Soto y la Dra. Raquel Ballesteros por compartir su conocimiento en clases, por su ayuda para mejorar en el laboratorio y sus consejos para hablar ante el público.

A mis amigos en el laboratorio Abigail, Ana, David, Daniel y Rodolfo, por su enorme ayuda en el laboratorio y compartir su experiencia. A toda la gente amable que conocí en biomédicas Anahí, Erick, Jared y Natty por apoyar me en la sutura y hacer que el tiempo transcurriera más rápido. No tengo suficientes palabras para agradecer a José Juan y a Sheila por toda su colaboración y amistad brindada, siempre estaré agradecido. Muchas Gracias a todos por hacer que cada día fuera un buen día para la ciencia. Así como al personal del Departamento de Histología de la facultad de Medicina UANL, en especial a Juany, Alicia, Don Ángel, Luis e Iván.

A mis mejores amigos Andrea, Annette, Azael, Bianka, Blanca, Elda, Elena, Jesús, Jorge, Marcos, Miguel, y Porfirio, por brindarme siempre su valiosa amistad, estar conmigo creando buenos recuerdos, llenando de alegría y diversión mi vida en los días más difíciles. Ustedes son pieza clave para la realización de cada proyecto que emprendo, por hacer que el estrés disminuya convirtiendo siempre la carga más ligera y siempre escuchar me para tener buenos consejos a seguir.

RESUMEN

LBG. Daniel Matta Yee Chig
Universidad Autónoma de Nuevo León
Facultad de Medicina

Fecha de titulación: octubre 2017

Título del Estudio: “Evaluación de la eficiencia del péptido RVG29m como vehículo para la entrega del gen CDNF en un modelo animal de la enfermedad de Parkinson”

Páginas del estudio: 57

Área del estudio: Morfología

**Candidato para el grado de Maestra en Ciencias
con Orientación en Morfología**

Propósito y Método del estudio

La Enfermedad de Parkinson (EP) se caracteriza por la pérdida de las células neuronales dopaminérgicas en la sustancia negra pars compacta (SNpc) y la reducción de los niveles de dopamina en el cuerpo estriado. La terapia génica es una herramienta con gran potencial en el tratamiento de las enfermedades neurodegenerativas. Los péptidos de penetración celular (CPPs) son un grupo de péptidos cortos que tienen la habilidad de entregar moléculas cargo pequeñas al interior de las células y no causan un daño en la integridad de la membrana celular. El péptido RVG29 es una secuencia de aminoácidos de la glucoproteína del virus de la rabia con la habilidad de los CPPs, y confiere tropismo hacia las neuronas del sistema nervioso central. Para aumentar la capacidad de transfección celular del péptido RVG29, se le introdujo una mutación de Asn194Lys. El factor neurotrófico de dopamina conservado (CDNF) tiene un efecto de protección de neuronas dopaminérgicas. El propósito de este estudio fue evaluar la eficiencia del péptido RVG29 mutante como transportador del gen CDNF en un modelo animal de la EP.

El péptido RVG mutante, un péptido cariofílico (KP) y un plásmido que codifica el gen CDNF se unieron mediante cargas electrostáticas para formar el complejo RVGm-KP-CDNF. La formación de los complejos se analizó mediante geles de agarosa para determinar la relación óptima de los componentes del complejo. Se asignaron cuatro grupos de estudio, el control, Paraquat (PQ), PQ+CDNF y CDNF. El complejo RVGm-KP-CDNF se inyectó mediante cirugía estereotáxica en el cuerpo estriado de cerebro de ratones C57BL6, al día 0 y a las 3 semanas. Para la inducción del modelo de EP se les administró PQ a los ratones vía intraperitoneal dos veces por semana, durante 6 semanas. Antes de sacrificar los ratones para el análisis histológico, se les evaluó la función motora y cognitiva.

Conclusiones y contribuciones

El péptido RVGm29 es eficiente en la entrega del CDNF en células del cerebro murino. El CDNF tiene un efecto protector de las neuronas dopaminérgicas e inhibe la astrogliosis y la activación de la microglía inducida por el PQ. También protege a los oligodendrocitos del daño causado por PQ. El complejo RVGm-KP-CDNF ayuda en la prevención de los síntomas motores en un modelo animal de la EP. Esta estrategia tiene potencial en el tratamiento de la EP.

Dra. Odila Saucedo Cárdenas
Director

Abstract

Evaluation of the efficiency of the peptide RVG29m as vehicle for delivery of CDNF gene in an Animal model of Parkinson's disease.

Parkinson's disease (PD) is characterized by the loss of dopamine (DA) neurons in the substantia nigra pars compact and reduction of the levels of dopamine in the striatum. Gene therapy is potentially, a powerful tool for treating neurodegenerative diseases. Cell-penetrating peptides (CPPs) are a group of short peptides, which have the ability to delivery cargo molecules into the cells without causing a significant lethal membrane damage. The RVG 29 peptide is an amino acid sequence of the rabies virus glycoprotein with the skill of the CPP's, which confers tropism to neurons of the central nervous system. To increase gene delivery to neuronal phenotype cells, a mutation of Asn194Lys was introduced into the RVG peptide. The conserved dopamine neurotrophic factor (CDNF) has neuroprotective effect on dopaminergic neurons. The purpose of this study was to assess the peptide RVG29 mutant like delivery vector of the CDNF gene in animal model of PD.

The peptide RVG29 mutant, a karyophilic peptide (KP) and a plasmid encoding the CDNF gene were bound by electrostatic charges to form the complex RVG29m-KP-CDNF. The RVG29m complex was mixed with gel-loading buffer and analyzed by gel retardation assays to determine the optimal ratio of the components of the complex. Four groups were assigned for the study: control, Paraquat (PQ), CDNF+PQ and CDNF. The complex was injected stereotactically into stratum in the brain in C57BL/6 mouse, at 0 day and 3 weeks. For the induction of PD model, the mice were injected intraperitoneal twice a week, by 6 weeks. Before sacrificing the mice for histological analysis, their motors and cognitive functions were analyzed.

The peptide RVG29m is efficient for the delivery of CDNF into brain cells of the mice. The CDNF has neuroprotective effect on dopaminergic neurons, inhibits the astrogliosis and the activation of microglia induced by PQ. Also protect the oligodendrocytes of the damage caused by PQ. The complex RVG29m-KP-CDNF helps in the prevention of the motors symptoms in an animal model of the PD. This strategy has the potential for PD treatment.

Índice

1. Introducción.....	1
2. Antecedentes	2
2.1. Enfermedad de Parkinson.....	2
2.2. Sistema dopaminérgico mesencefálico	3
2.3. Factores neurotróficos.....	4
2.4. Factor neurotrófico de dopamina conservado	7
2.5. Sistemas de entregas de moléculas al cerebro.....	8
2.6. Péptidos con capacidad de penetración celular	9
2.7. Péptidos con capacidad de penetración celular como vectores neurotróficos	12
2.8. Glucoproteína del Virus de la Rabia.....	12
2.9. Mecanismo de internalización de RVG29	14
2.10. Péptidos con señal de localización nuclear	14
2.11. Modelo animal de la enfermedad de Parkinson	15
3. Justificación.....	18
4. Hipótesis	18
5. Objetivo general	18
6. Objetivos específicos	19
7. Estrategia general	19
8. Materiales.....	20
8.1. Material biológico	20
8.1.1. Péptidos.....	20
8.1.2. Animales.....	20
8.1.3. Anticuerpos.....	20
8.2. Reactivos	20
8.3. Soluciones.....	21
8.4. Equipo de laboratorio	21
8.5. Consumibles	22

9.	Metodología	23
9.1.1.	Preparación de los complejos RVG29 y caracterización por geles de retardo... ..	23
9.1.2.	Cirugía estereotáxica.....	23
9.1.3.	Modelo animal de la enfermedad de Parkinson con paraquat	24
9.1.4.	Evaluación de la función cognitiva.....	24
9.1.5.	Evaluación de la disfunción motora.....	24
9.1.6.	Obtención de los tejidos.....	25
9.1.7.	Inmunofluorescencia	25
9.1.8.	Análisis estadístico	26
10.	Resultados.....	27
10.1.	Relación óptima para la formación del complejo	27
10.2.	El CDFN disminuye la disfunción cognitiva causada por el paraquat	28
10.3.	El CDFN disminuye la disfunción motora causada por el paraquat	31
10.4.	El CDFN protege a las neuronas dopaminérgicas del daño causado por el paraquat.....	35
10.5.	El CDFN inhibe la proliferación de astrocitos (astroglisis) inducida por el paraquat.....	37
10.6.	El CDFN inhibe la activación de la microglía inducida por el paraquat... ..	39
10.7.	El CDFN protege a los oligodendrocitos del daño causado por el paraquat.....	41
11.	Discusión	44
12.	Conclusiones	49
13.	Bibliografía.....	50
14.	Anexos	57

Índice de Figuras

Figura 1. Esquema del sistema dopaminérgico mesencefálico.....	3
Figura 2. Esquema sobre los principales sistemas de entrega en el cerebro.	9
Figura 3. Péptidos con capacidad de penetración celular como herramienta para la entrega de moléculas cargo.	10
Figura 4. Aplicación de los CPPs para la entrega de moléculas cargo en los diferentes destinos.	11
Figura 5. Estructuras químicas neurotóxicas utilizadas en modelos animales de la enfermedad de Parkinson	16
Figura 6. Estrategia general.	19
Figura 7. Gel de retardo de agarosa del complejo RVG29m-KP-CDNF.....	27
Figura 8. Evaluación del comportamiento.	31
Figura 9. Evaluación de la función motora.	33
Figura 10. Representación gráfica de los parámetros seleccionados para el análisis de la marcha.....	33
Figura 11. Evaluación de la función motora con el análisis de marcha.	35
Figura 12. El complejo RVG29m-KP-CDNF protege las neuronas dopaminérgicas del daño causado por el paraquat.....	37
Figura 13. El complejo RVG29m-KP-CDNF inhibe la proliferación de astrocitos (astroglisis).	39
Figura 14. El complejo RVG29m-KP-CDNF inhibe la activación de la microglía (microgliosis).	41
Figura 15. El complejo RVG29m-KP-CDNF protege a los oligodendrocitos de la muerte causada con el paraquat.....	43
Figura 16. Plásmido de expresión del gen CDNF.	57
Figura 17. Modelos experimentales de la enfermedad de Parkinson.....	58

Índice de tablas

Tabla 1. Ensayos clínicos de factores neurotróficos para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas.....	6
Tabla 2. Sistema de puntuación de la construcción del nido con algodón.	29
Tabla 3. Criterios de evaluación de la postura y movimiento.	32

Lista de abreviaturas

Abreviatura	Nombre
%	Por ciento
°C	Grados centígrados
6-OHDA	6-hidroxidopamina
Aa	Aminoácidos
AAV	Virus Adenoasociados (por sus siglas en inglés)
AP	Anteroposterior
AChR	Receptor acetilcolina
BHE	Barrera hematoencefálica
BDNF	Factor neurotrófico derivado del cerebro
CDNF	Factor neurotrófico de dopamina conservado
CNTF	Factor neurotrófico ciliar
Col	Colaboradores
CPPs	Péptidos con capacidad de penetración celular (por sus siglas en Inglés)
CNPase	2',3'-nucleotido cíclico 3'-fosfodiesterasa (por sus siglas en inglés)
DAPI	4',6-Diamida-2-fenidol
DAergic	Neuronas dopaminérgicas
DNA	Ácido desoxirribonucleico (por sus siglas en inglés)
DV	Dorsoventral

EA	Enfermedad de Alzheimer
ELA	Esclerosis lateral amiotrófica
ENG's	Enfermedades neurodegenerativas
EP	Enfermedad de Parkinson
FITC	Isiotiocianato de fluoresceína (por sus siglas en inglés)
GDNF	Factor neurotrófico de la línea celular glial
GFP	Proteína verde fluorescente (por sus siglas en ingles)
GFAP	Proteína fibrilar acídica de la glía
h	Hora
H ₂ O	Agua
IBA-1	Molécula adaptadora de unión a calcio ionizada 1 (por sus siglas en ingles.)
i.p.	Intraperitoneal
IF	Inmunofluorescencia
IGF-1	Factor de crecimiento similar a la insulina 1
IHQ	Inmunohistoquímica
Kb	Kilo base
kDa	Kilo Dalton
KP	Péptido cariofílico (por sus siglas en ingles)
lb	Libras
MANF	Factor neurotrófico derivado de astrocitos mesencefálicos (por sus siglas en ingles)
Mg	Miligramo
min	Minuto
mL	Mililitro

mM	Mili molar
mm	Milímetro
ML	Medio lateral
nAChRs	Receptores de acetilcolina nicotínicos
ng	Nanogramo
NGF	Factor de crecimiento nervioso
NLS	Señalización de localización nuclear (por sus siglas en inglés)
NTN	Neurturina
NTFs	Factores neurotróficos o neurotrofinas
p<	Grado de significancia
pDNA	ADN plasmídico
Pb	Pares de bases
PBS	Buffer fosfato salino (por sus siglas en inglés)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (por sus siglas en inglés)
PFA	Paraformaldehído
PQ	Methyl viologen hydrate 98% organics (Paraquat)
RVG29	Péptido de la glucoproteína del virus de la rabia.
rpm	Revoluciones por minuto
s	Segundo
siRNA	ARN pequeños de interferencia (por sus siglas en ingles)
SFB	Suero fetal bovino
SN	Sustancia negra
SNC	Sistema nervioso central
SNpc	Sustancia negra pars compacta

TH	Tirosina hidroxilasa (por sus siglas en ingles)
TAE	Tris-acetato-EDTA (buffer)
U	Unidades
VTA	Área tegmental ventral
µg	Microgramo
µM	Micro molar
µm	Micrómetro

1 Introducción

Las enfermedades neurodegenerativas (ENG's) como el Alzheimer, la esclerosis múltiple amiotrófica y la enfermedad de Parkinson (EP) se definen por la pérdida progresiva de células neuronales. La EP se caracteriza específicamente por la pérdida de las células neuronales dopaminérgicas en la sustancia negra pars compacta (SNpc) y la reducción de los niveles de dopamina en el cuerpo estriado (Dawson & Valina, 2003). La EP es multifactorial y una de las características común entre las ENG's es la extensa evidencia del estrés oxidativo, el cual, es el responsable de la disfunción o muerte de las células neuronales que contribuyen a la patogénesis de la enfermedad (Emerit, Edeas, & Bricaire, 2004).

Se han desarrollado numerosos tratamientos para ENG's que sean efectivos y específicos para las células y procesos afectados. La terapia génica es una herramienta con gran potencial en el tratamiento de las ENG's. La terapia génica se ha enfocado en tres principales áreas para obtener mejores resultados como: 1) el diseño de vectores, 2) identificación de nuevos blancos terapéuticos y 3) modelos de entrega de genes terapéuticos como virus adenoasociados, lentivirus y péptidos con capacidad de penetración celular (CPPs). La terapia génica para ENG's tiene un mayor grado de dificultad, debido a la barrera hematoencefálica (BHE), es la principal barrera que impide el paso de la mayoría de los vectores al SNC (O'Connor & Boulis, 2015).

La estrategia en este trabajo consiste en la entrega del gen del factor neurotrófico de dopamina conservado (CDNF) mediante CPPs. Los CPPs son un grupo de péptidos que tienen la habilidad de cruzar la membrana celular sin causar un daño en la integridad de la membrana celular. Es por esta razón que los CPPs pueden atravesar varios epitelios, endotelios y la barrera hematoencefálica, constituyendo de esta manera una herramienta eficiente para la entrega de genes terapéuticos (Huang, Lee, Tolliver, & Aronstam, 2015; Kristensen, Birch, & Nielsen, 2016).

2 Antecedentes

2.1 Enfermedad de Parkinson

La enfermedad de Parkinson (EP) es un trastorno neurodegenerativo progresivo y es la segunda causa más frecuente de enfermedad degenerativa después de la enfermedad de Alzheimer. Este padecimiento se empieza a manifestar en personas mayores a los 60 años, con una prevalencia en México entre 40 a 50 casos por cada 100 mil habitantes/año (Secretaría de Salud, 2010). Fue descrita en 1817 por James Parkinson en el “ensayo sobre la parálisis agitante”. La etiología de la enfermedad aún se desconoce y los análisis genéticos, epidemiológicos, investigaciones neuropatológicas y nuevos modelos experimentales de la EP han proporcionado nuevas e importantes perspectivas sobre la patogénesis (Dawson & Valina, 2003; Wirdefeldt, Adami, Cole, Trichopoulos, & Mandel, 2011).

Una perspectiva es que solo el 10% de los casos de la EP se relaciona con mutaciones en genes específicos, como SNCA, DJ-1, PINK1, LRRK2 y Parkin, que se encuentran en al menos 10 loci distintos, siendo estos los responsables de las formas mendelianas raras de este padecimiento. Sin embargo, el 90% de los casos de la EP provienen de una condición esporádica (Dawson & Valina, 2003; Rodriguez-Rocha et al., 2012).

La EP se manifiesta clínicamente por cuatro síntomas motores generales como lo son el temblor, la rigidez muscular, la bradicinesia y la inestabilidad postural. Otros síntomas que se pueden incluir son síntomas psiquiátricos como la ansiedad y la depresión. Asimismo, se ha observado una disminución cognitiva a medida que la enfermedad progresa (Wirdefeldt, Adami, Cole, Trichopoulos, Mandel, et al., 2011).

El principal hallazgo patológico de la EP asociado con el déficit motor es la pérdida de neuronas dopaminérgicas (DAérgicas) en la SNpc, que conlleva a una pérdida del neurotransmisor dopamina en el cuerpo estriado. Los síntomas no se manifiestan hasta que se pierde entre un 50-60% de neuronas en la sustancia negra

y la reducción entre un 80-85% del contenido de dopamina en el cuerpo estriado (Wirdefeldt, et. al., 2011).

2.2 Sistema dopaminérgico mesencefálico

El sistema dopaminérgico mesencefálico presenta tres vías importantes a partir de sus sitios de proyección: 1) nigroestriatal, 2) mesolímbica y 3) mesocortical. El sistema dopaminérgico nigroestriatal tiene su origen en la SNpc del mesencéfalo y se proyecta hacia los ganglios basales del cuerpo estriado. Esta vía influye en el sistema motor extrapiramidal, que sirve a los sistemas motores voluntarios y permite movimientos involuntarios motores. La destrucción de neuronas dopaminérgicas en esta vía se ha asociado con la EP (Austin, Boyd, & Austin, 2010).

Los orígenes del sistema dopaminérgico mesolímbico y mesocortical se encuentran en el mesencéfalo, en el área tegmental ventral (VTA), la vía mesolímbica se proyecta al núcleo accumbens del sistema límbico, mientras que la vía mesocortical se proyecta a la corteza prefrontal. La vía mesolímbica influye fuertemente en las emociones y tiene proyecciones que afectan la memoria y la recepción auditiva. La vía mesocortical principalmente tiene efectos en la cognición, incluyendo funciones como el razonamiento, la comprensión y la capacidad de generalizar el aprendizaje (Moore & Puri, 2012).

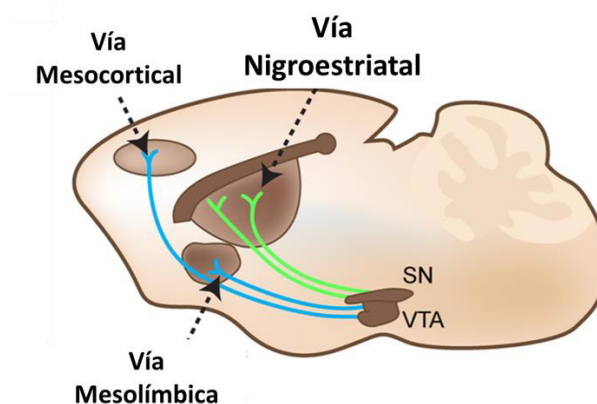


Figura 1. Esquema del sistema dopaminérgico mesencefálico.
(Money & Stanwood, 2013)

2.3 Factores neurotróficos

La terapia de la EP se ha enfocado principalmente en la administración de Levo-DOPA, la cual alivia por periodos limitados de tiempo los síntomas de la EP, pero no inhibe la progresión hacia la neurodegeneración. Por lo tanto, se han buscado terapias alternativas como el uso de las neurotrofinas, también conocidos como factores neurotróficos (NTFs) (Harris & Jenner, 2012).

Los NTFs son proteínas esenciales para la supervivencia, diferenciación y proliferación neuronal durante el desarrollo del SNC. Además, son requeridos para el buen funcionamiento de las neuronas, ya que estimulan el crecimiento de axones y dendritas. Los NTFs son de gran interés clínico, siendo una opción terapéutica ideal que alberga grandes esperanzas para revertir el daño neuronal observado en diversas ENG's (Bartus & Johnson, 2017a; Weissmiller & Wu, 2012)

Se han realizado diversas pruebas clínicas con el fin de evaluar la seguridad y la eficiencia de los NTFs para tratamientos de diferentes enfermedades, sin embargo se ha logrado una baja eficiencia terapéutica, atribuyéndose posiblemente a las dosis ineficientes y a la dificultad que representa la entrega de los NTFs al cerebro (Bartus & Johnson, 2017b).

Entre los NTFs que han sido ampliamente estudiados con fines terapéuticos para ENG's se encuentran factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF), factor neurotrófico derivado de línea celular glial (GDNF), neurturina (NRTN), factor neurotrófico derivado de astrocito mesencefálico (MANF) y el factor neurotrófico dopamina conservado(CDNF) (tabla 1). En investigaciones *in vitro* se observó que el BDNF potenciaba la supervivencia de neuronas dopaminérgicas y la protección contra las neurotoxinas MPP⁺ y 6-hidroxidopamina (6-OHDA) en un cultivo celular de la línea SH-SY5Y. El NTF más potente para las neuronas dopaminérgicas descrito es el GDNF. El GDNF ha demostrado tener efectos positivos en modelos de la EP en roedores y primates, pero no tiene efectos neuroprotectores en algunos modelos de la EP donde la α -synucleína se sobreexpresa. En pacientes de EP, se utilizó como terapia génica la NRTN un miembro de la familia de ligandos GDNF, la

cual fue entregada mediante el virus adenoasociado tipo 2 que mostró un modesto efecto benéfico comparado con el placebo en un ensayo clínico. Sin embargo, GDNF y NTN son proteínas básicas de unión con alta afinidad al proteoglicano heparán sulfato en la matriz extracelular, los cuales restringen su difusión en el cerebro (SPINA & HYMAN, CAROLYN, 1992;Lo Bianco, Déglon, Pralong, & Aebischer, 2004; Marks et al., 2008; Norisada, Hirata, Amaya, Kiuchi, & Oh-Hashi, 2016)

En un modelo animal de la EP inducido con 6-OHDA, se utilizó el factor neurotrófico derivado de astrocitos mesencefálicos (MANF) como terapia génica, demostrando que tiene un efecto neuroprotector y neuro restaurador sobre las neuronas dopaminérgicas, en un modelo que imita el proceso lento de neurodegeneración que ocurre por años en pacientes con EP (Voutilainen et al., 2009).

El CDNF fue identificado por primera vez por las herramientas de bioinformática y luego se caracterizó bioquímicamente. La proteína pre-CDNF tiene 187 aminoácidos de longitud mientras que la proteína CDNF madura comprende 161 residuos de aminoácidos con un peso molecular de 18 kDa. La terapia génica con CDNF ha mostrado un efecto regenerativo en el modelo de lesión del nervio ciático de la rata. Además de los efectos neurotróficos, estudios recientes en cultivo primario de células gliales sugieren que tiene efectos anti-inflamatorios (Lindholm et al., 2007; Nadella et al., 2014).

Tabla 1. Ensayos clínicos de factores neurotróficos para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas.

Factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGF-1), factor neurotrófico ciliar (CNTF), Factor de crecimiento nervioso (NGF), esclerosis lateral amiotrófica (ELA) y enfermedad de Alzheimer (EA) (Kotzbauer & Holtzman, 2006).

Factor Neurotrófico	Blanco (enfermedad)	Método de entrega	Resultados	Efectos adversos
IGF-1	Neuronas motoras (ELA)	Inyección subcutánea	Modesto o sin mejora en progresión de los síntomas	Ninguno
CNTF	Neuronas motoras (ELA)	Inyección subcutánea	Sin mejoría en la disminución de fuerza muscular	Anorexia, pérdida de peso y tos
BDNF	Neuronas motoras (ELA)	Inyección subcutánea	Mejora en supervivencia de algunos subgrupos	Ninguno
GDNF	Sustancia negra (EP)	Inyección Intracerebro-ventricular	Sin mejora en la clasificación de los signos motores	Hiponatremia y anorexia
GDNF	Sustancia negra (EP)	Infusión intraputamenal	Sin mejora en la clasificación de los signos motores	Ninguno
NTN	Sustancia negra (EP)	Terapia génica	Modesto o Sin mejora en la clasificación de los signos motores	Ninguno
NGF	Cerebro anterior basal (EA)	Terapia génica ex vivo	Mejora en los estudios de tomografía por emisión de positrones	Ninguno

2.4 Factor neurotrófico de dopamina conservado

El CDNF, recientemente identificado, parece ser más selectivo y efectivo para las neuronas dopaminérgicas que los otros NTFs conocidos como GDNF y BDNF, y se ha encontrado altos niveles de transcripción de este factor neurotrófico en el nervio óptico y el cuerpo calloso, que están carentes de células neuronales y contienen principalmente proyecciones de axones y oligodendrocitos. En estudios *in vivo* se ha demostrado que el CDNF impide que la 6-OHDA tenga efecto de degeneración en neuronas dopaminérgicas, comprobando la capacidad del CDNF en la protección y rescate de neuronas dopaminérgicas mesencefálicas. Un grupo de investigadores se han enfocado en las propiedades farmacocinéticas del CDNF al infundirse directamente como proteína en el cuerpo estriado, obteniendo como resultados que la proteína es internalizada. La proteína es endocitada por neuronas corticales y estriadas para ser transportada de manera retrógrada a la sustancia negra. Además, se ha demostrado que la infusión directa de la proteína hCDNF en el cuerpo estriado, se difunde de manera rápida y amplia con una vida media de 5.5 horas (Lindholm et al., 2007; Mätlik et al., 2017).

Previos trabajos han demostrado la importancia de la terapia génica para la entrega del gen CDNF al cuerpo estriado en un modelo animal de EP con 6-OHDA, utilizando un virus adeno-asociado serotipo 2 (AAV2) recombinante. El primer estudio demostró que la administración de AAV2-CDNF produce una recuperación significativa de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra después de inducir la EP. En un segundo estudio se comparó el efecto del gen CDNF con el de GDNF, ambos entregados por un AAV2, demostrando que una sola inyección de AAV2-CDNF permite una prolongada expresión de hCDNF en el cerebro murino y que tanto AAV2-CDNF como AAV2-GDNF fueron capaces de inducir la recuperación funcional de los circuitos neuronales que controlan el movimiento (Back et al., 2013; Ren et al., 2013)

2.5 Sistemas de entregas de moléculas al cerebro

La función de la barrera hematoencefálica (BHE) es proteger el cerebro, siendo establecida por medios físicos, de transporte y metabólicos, explicando su permeabilidad selectiva para iones y macromoléculas (Stalmans et al., 2015).

La incapacidad de cruzar la BHE y la escasa selectividad, representan algunos de las principales limitantes en la terapia basada en NTFs. Por lo tanto, se han buscado nuevas estrategias más eficaces para la entrega de estos factores (Figura 2).

Para lograr esto, se necesita un vector que presente una alta compatibilidad con el tejido hospedero, ausencia de reacciones inmunológicas, mínimo daño en el lugar de la inyección y controlar la liberación de la proteína en el SNC (Harris & Jenner, 2012).

El principal sistema de entrega que se utiliza, son los vectores virales como los lentivirus, adenovirus y virus adenoasociados (AAV) debido a su capacidad de transfectar efectivamente a las células, sin embargo, presentan problemas de inmunogenicidad, citotoxicidad y el riesgo de insertar una mutagénesis y de oncogénesis (Gray, Woodard, & Samulski, 2010; Sullivan & O'Keeffe, 2016).

Se han realizados progresos significativos en la entrega de genes con vectores no virales, sin embargo, los vectores sintéticos siguen siendo menos eficientes, ya que por sí solos no tienen capacidad de dirección a una célula blanco, pero tienen como ventaja una flexibilidad química que permite la adición de moléculas para direccionamiento celular específico. Otro sistema de entrega de genes con diferentes tipos de sistema son los vectores lipídicos, utilizando liposomas neutrales o aniónicos se ha demostrado que el DNA plasmídico (pDNA) es encapsulado dentro de vesículas, y la estructura del liposoma permanece sin carga. Sin embargo, los vectores lipídicos tienen dificultades para encapsular la suficiente cantidad de DNA dentro de las vesículas y otro de los obstáculos en el desarrollo de vectores lipídicos como el lipoplex para la entrega de genes *in vivo* es la baja expresión del transgén (da Cruz, Et. al., 2011; Misra, 2011).

En las últimas dos décadas se ha generado un gran interés biomédico en el uso de sistemas de entrega no viral llamados Péptidos con Capacidad de Penetración Celular (CPPs) debido a sus ventajas de ser flexibles y fáciles de ensamblar, de presentar una toxicidad mínima y con bajos niveles de inmunogenicidad e inserción de mutagénesis (Huang et al., 2015).

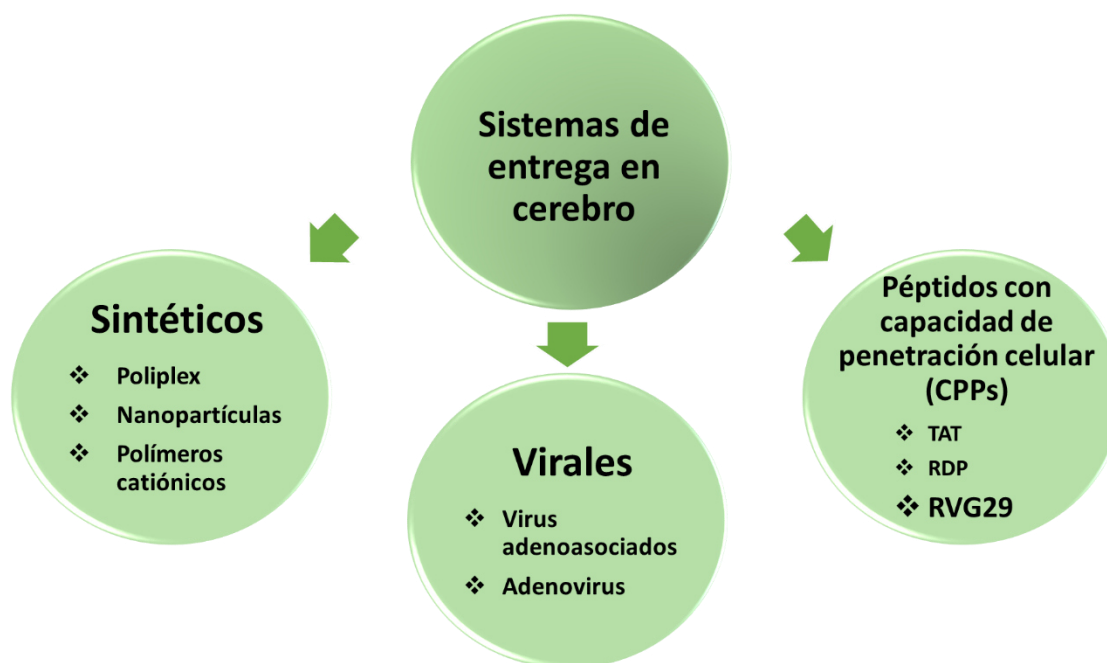


Figura 2 Esquema sobre los principales sistemas de entrega en el cerebro.
(Villa-Cedillo SA., 2017)

2.6 Péptidos con capacidad de penetración celular

Los CPPs son polipéptidos de 10 a 30 aa que tienen la habilidad de penetrar la membrana plasmática sin causar afectar la integridad de la membrana celular y siendo eventualmente degradados metabólicamente después de la entrega de la molécula cargo. Debido a esta capacidad, pueden servir como una herramienta para la entrega de sustancias impermeables a las células como: proteínas, anticuerpos, oligonucleótidos anti-sentido, siRNA, plásmidos, fármacos, compuestos fluorescentes y nanopartículas (Figura 3). La unión de las moléculas cargo con los CPPs puede ser covalente y no covalente, las interacciones covalentes incluyen enlaces disulfuro, enlaces aminos o un enlazador específico, mientras que las

interacciones no covalentes incluyen interacción biotina-estreptavidina, interacciones electrostáticas e interacciones con afinidad a iones metálicos. Las ventajas de usar CPPs unidos no covalentemente con la molécula cargo es que son fáciles de usar y de producir, versatilidad con respecto a la composición de la molécula cargo y preservación de la funcionalidad de la molécula cargo (Huang et al., 2015; Kristensen et al., 2016; Tashima, 2017).

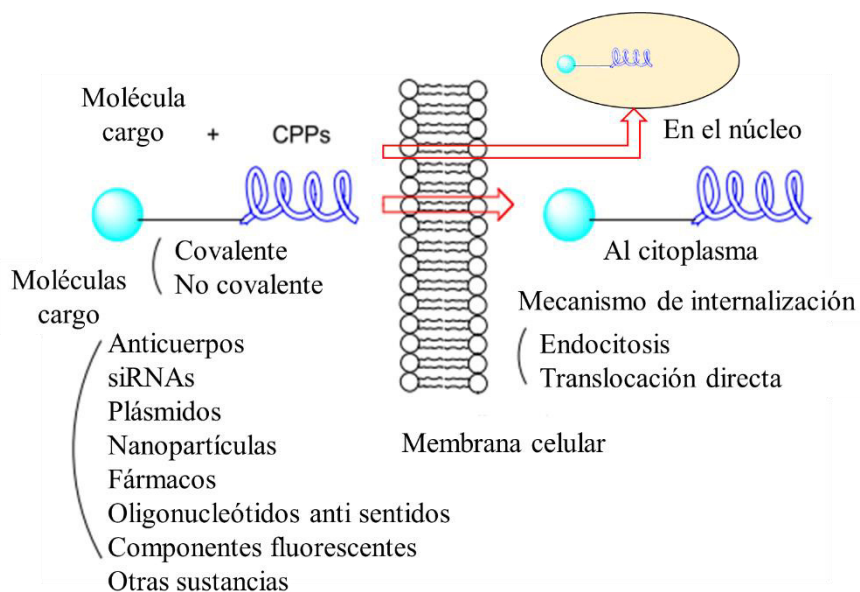


Figura 3. Péptidos con capacidad de penetración celular como herramienta para la entrega de moléculas cargo.
(Tashima, 2017)

Aún existe controversia en el mecanismo exacto de penetración, pero existe un consenso en el cual está involucrada la endocitosis y el mecanismo de penetración directa. Sin embargo, múltiples mecanismos pueden simultáneamente ser activados y el mecanismo empleado no solo depende del péptido estudiado, sino del tipo celular empleado, de la concentración del péptido y de la molécula cargo adherida (Stalmans et al., 2015).

En general los CPPs tienen 5 principales características (1) poseen menos de 30 aa, (2) son ricos en arginina y lisina, (3) están cargados positivamente o sean anfipáticos, (4) son fáciles de preparar y (5) no son tóxicos (Huang et al., 2015).

El primer CPPs que fue descrito por dos grupos independientes, está compuesto por un dominio de transducción de proteínas (PTD) derivado del transactivador de la transcripción (TAT) del virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1), el cual contiene once aminoácidos (YGRKKRRQRRR) que son responsables de la entrada celular del péptido TAT. Diez años después del descubrimiento de este péptido se demostró *in vitro* su potencial como vector para la entrega de proteínas dentro de la célula, y durante los siguientes años se confirmó su efecto *in vivo*, debido a que la β -galactosidasa fue distribuida a diversos tejidos, incluyendo el cerebro, después de inyectar por vía intraperitoneal la fusión de Tat- β -galactosidasa en ratones. Desde entonces se han explotado los CPPs como vectores no virales para la entrega de moléculas cargo terapéuticas, por su habilidad de atravesar epitelios, membranas plasmáticas y la BHE (Figura 4) (Wu et al., 2006).

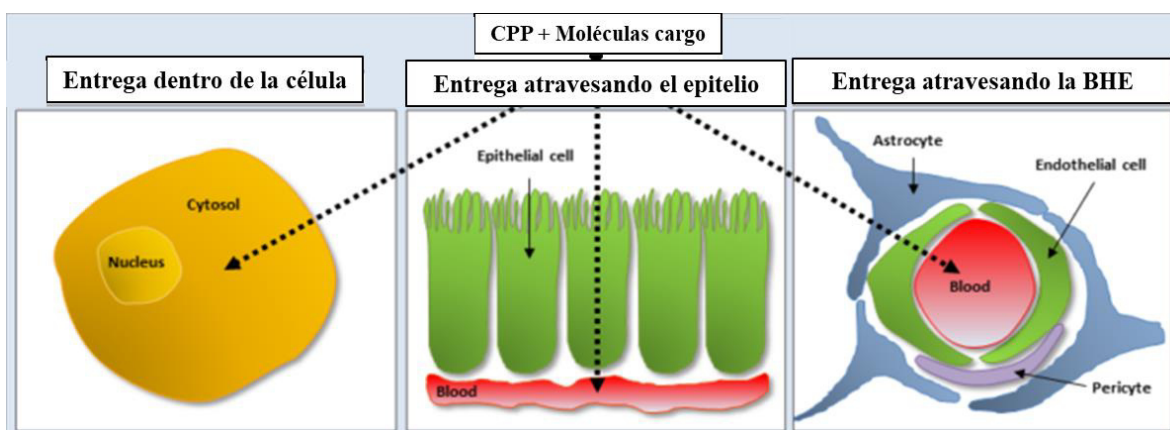


Figura 4. Aplicación de los CPPs para la entrega de moléculas cargo en los diferentes destinos.

Los CPPs dependiendo de su naturaleza pueden entregar a diferentes destinos celulares (Kristensen et al., 2016).

Con la finalidad de incrementar la eficiencia de los CPPs se han realizado investigaciones en las que se modifican algunos aminoácidos de péptidos, añadiendo residuos ricos en argininas, los cuales resultan ser más efectivos, ya que la adición de una cola de poli-Arg a dichos péptidos, permite una translocación más eficiente, debido a que las cargas positivas de las argininas se unen a los grupos fosfato de fosfolípidos de la membrana, produciendo fuertes distorsiones de la bicapa con respecto a su estructura de reposo que conducen a la formación de un poro permitiendo la entrada de los CPPs (Herce et al., 2009; Tao & Johns, 2010).

2.7 Péptidos con capacidad de penetración celular como vectores neurotróficos

Como se mencionó uno de los CPPs más estudiados es el TAT el cual fue el primero en describirse como un vector no viral para la entrega de moléculas cargos al cerebro debido a su capacidad de penetración a través de la BHE. Este CPP está compuesto por PTD fusionado a la proteína tirosina hidroxilasa (TH), formando un complejo que permitió la entrega hacia al cerebro en un modelo terapéutico de la EP murina; demostrando así que el péptido TAT funciona como vehículo de entrega de macromoléculas hacia el cerebro (Wu et al., 2006).

Tras años de investigación sobre los CPPs permitieron establecer que la capacidad de penetración celular se encuentra ligada a las funciones de las proteínas de las que se origina y dicha característica se encuentra altamente conservada en la secuencia del péptido. Entre los CPPs de mayor interés se encuentra la Glucoproteína del Virus de la Rabia (RVG por sus siglas en inglés), debido a que es el único componente proteico de la envoltura viral que interviene en la entrada celular. Por otro lado, se encontró un péptido derivado del RVG con una secuencia de 39 aa conocido como RDP, que presenta habilidad de transportar proteínas de diferente tamaño por vía intraperitoneal hacia el cerebro en un modelo *in vivo*, así como entregar pDNA que codificaba el gen BDNF por vía intravenosa hacia el cerebro en un modelo animal de la EP (Fu, Zhang, Gao, Xu, & Chen, 2013; Stalmans et al., 2015).

2.8 Glucoproteína del Virus de la Rabia

La rabia es una de las enfermedades zoonóticas más letales, de origen viral, que se puede manifestar como una encefalomiелitis en personas infectadas, provocando una muerte inevitable. El virus de la rabia es un virus de RNA de hebra simple, con polaridad negativa y un genoma simple de 12kb. Pertenece a la familia de los Rhabdoviridae y del género Lyssavirus, los cuales consisten en una colección de virus genéticamente relacionados, adaptados para su replicación en el sistema nervioso de los mamíferos (Ross, Favi, & Vasquez, 2008).

El virus de la rabia codifica cinco proteínas: una nucleoproteína, una fosfoproteína, una proteína de matriz, una glicoproteína y una RNA polimerasa. El RNA viral, quien es siempre encapsulado por la nucleoproteína, forma la ribonucleoproteína (RNP), la cual es la plantilla para la replicación y transcripción viral. La RNP junto con la fosfoproteína y la RNA polimerasa forman el complejo de replicación viral (Pulmanausahakul, Li, Schnell, & Dietzschold, 2008).

Este virus afecta principalmente a las neuronas motoras debido a que entra atravesando la unión neuromuscular durante el proceso de infección del músculo y un factor clave en dicha neuro-invasión es la propagación neuronal transináptica (Huey & Hawthorne, 2016).

La glucoproteína del virus de la rabia (RVG por sus siglas en inglés) está organizada como un trímero, siendo la única proteína expuesta en la superficie del virión que interactúa con receptores celulares, difundándose desde el sitio postsináptico al sitio presináptico dentro del SNC, determinando el transporte retrógrado del virus dentro de los axones (Astray, Jorge, & Pereira, 2017; DEAN, EVANS, & MCCLURE, 1963)

La RVG es una glucoproteína de membrana tipo 1 de unos 505 aminoácidos y la responsable de la infección neuronal por el virus de la rabia. Debido al neurotropismo conferido por esta proteína RVG, algunos fragmentos de esta proteína se han utilizado en el transporte de moléculas cargadas al cerebro. Un péptido corto de 29 aminoácidos de la proteína RVG (RVG29) se utilizó para dirigir siRNA al SNC mediante una aplicación intravenosa, logrando inhibir la expresión del virus de la encefalitis japonesa, además, este grupo demostró que el RVG29 interactúa específicamente con células de tipo neuronal (Kumar et al., 2007).

Nuestro grupo de trabajo utilizó el péptido RVG29; estudios indican que RVG29 interactúa específicamente con el receptor nicotínico de acetilcolina (nAChR) para permitir la entrada a neuronas con este receptor. A este péptido se le realizó un cambio de un aminoácido en el sitio de unión al nAChR, sustituyendo Asn194 en

lugar de Lys194, logrando aumentar la capacidad de transfección celular del péptido RVG (Villa-Cedillo et al., 2017).

2.9 Mecanismo de internalización de RVG29

La α -bungarotoxina del veneno de serpiente (BTX) presenta afinidad por el sitio de unión al AChR, sin embargo, cuando se encuentra presente el péptido corto (29 aa) derivado del RVG, éste competirá con BTX, inhibiendo su unión al AChR. demostrando que el AChR permite la entrada del virus de la rabia. La detección de núcleos de AChR en las uniones conjuntivas indica como favorecen la internalización del virus de la rabia a través de la unión neuromuscular permitiendo su consecuente transportación al SNC. Por lo tanto, esto nos da un indicio de que probablemente RVG29 también se internalice a las células mediante la interacción por esta vía (Lentz, Burrage, Smith, Crick, & Tignor, 1982; Schnell, McGettigan, Wirblich, & Papaneri, 2009).

2.10 Péptidos con señal de localización nuclear

El intercambio molecular a través de la envoltura nuclear tiene lugar a través del complejo de poro nuclear (NPC), el cual es un obstáculo para cualquier macromolécula exógena que quiera entrar al núcleo. La mayoría de las proteínas y los ARNs requieren de un mecanismo de transporte selectivo mediado por señales de localización nuclear para la importación en el núcleo (Salman et al., 2005).

Las señales de localización nuclear (NLS por sus siglas en inglés) son secuencias de aminoácidos cortas que se requieren para el transporte nuclear de proteínas cariofílicas. Las propiedades de las NLS se han tomado como ventajas para potenciar la eficiencia de importación nuclear de DNA transgénico (Collas & Aleström, 1997).

Reportes indican que pDNA desnudo (alrededor de 50KDa) puede difundirse del citoplasma al núcleo cruzando la envoltura nuclear, pero moléculas de DNA grandes es difícil que crucen la envoltura nuclear, y aunado con la presencia de las nucleasas citoplasmáticas, la eficiencia de transfección disminuye. Por lo que

existen tres posibilidades para que el DNA entre al núcleo: i) en la desintegración de la membrana nuclear durante la mitosis, ii) en el transporte a través de los poros nucleares, iii) activando un transporte nuclear de membrana, usando proteínas cariofílicas como vehículo de transferencia. El uso de un péptido cariofílico como NLS aumenta la eficiencia de transfección, ya que permite la importación al núcleo por métodos no virales (Pérez-Martínez, Guerra, Posadas, & Ceña, 2011).

2.11 Modelo animal de la enfermedad de Parkinson

Un modelo ideal de la EP debería consistir en imitar las características patológicas y clínicas de la EP que involucra tanto los sistemas dopaminérgicos como los no dopaminérgicos, el sistema nervioso central y periférico, además de los síntomas motores y no motores. Asimismo, reflejar el inicio dependiente de la edad y la naturaleza progresiva de éste padecimiento (Tieu, 2011).

Estos modelos se establecen con neurotoxinas (Figura 5) como la 6-OHDA que es un análogo de la dopamina; el MPTP es lipofílico con capacidad de atravesar la BHE y es metabolizado por los astrocitos hasta convertirlo en MPP⁺ que es el inhibidor del complejo I mitocondrial. La rotenona que funciona de la misma manera que el MPP⁺, como inhibidor del complejo I mitocondrial; y el paraquat que presenta la capacidad de atravesar la BHE produciendo principalmente toxicidad a la mitocondria mediante el ciclo redox por la generación de ROS (Fricke et al., 2016; Meredith & Rademacher, 2012).

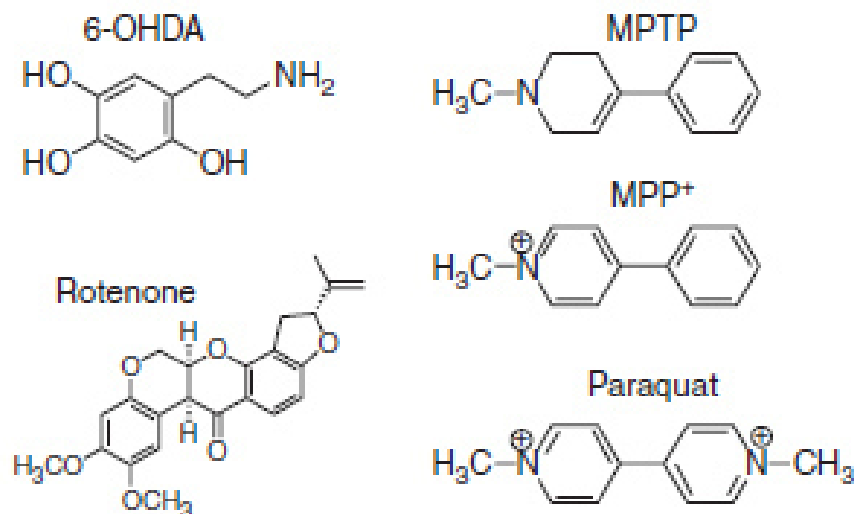


Figura 5 Estructuras químicas neurotóxicas utilizadas en modelos animales de la enfermedad de Parkinson
(Tieu, 2011)

La neurotoxina 6-OHDA es la forma oxidada de la dopamina, fue la primera identificada en los años 50. Inicialmente se reportó que causaba reducción de noradrenalina en el corazón de ratones. En 1968 se reportó que el 6-OHDA puede inducir daño en las terminales nerviosas adrenérgicas simpáticas. En la actualidad se utiliza para lesionar la vía nigroestriatal con el fin de inducir alteraciones motoras e inducir la EP en modelos murinos. La 6-OHDA se administra directamente en el cuerpo estriado; la neurotoxina se acumula en el citosol donde se oxida fácilmente conduciendo a la generación de especies reactivas de oxígeno y en última instancia, la citotoxicidad relacionada con el estrés oxidativo (Thoenen & Tranzer, 1968; Voutilainen et al., 2009).

El 1-metil-4-fenil-4-propionoxipiperidina (MPTP) fue descubierto por primera vez por un estudiante de química en 1976 que estaba tratando de sintetizar una heroína sintética, pero en su lugar produjo esta toxina que mata a las neuronas dopaminérgicas. Al inicio de los 80 otros adictos a la heroína replicaron el error y desarrollaron síntomas similares a la EP. El Dr. Langston, que trató a muchos de estos pacientes, reconoció el potencial de esta toxina para crear un modelo de la EP. El mecanismo de toxicidad del MPTP ha sido extensamente estudiado y caracterizado. El MPTP atraviesa la BHE debido a que es lipofílico, donde una vez

localizado en el cerebro, es metabolizado por la monoamino oxidasa B, y posteriormente convertido en el catión tóxico activo 1-metil-4-fenilpiridinio (MPP⁺, Figura 5), el cual no es capaz de atravesar por si solo la BHE. El MPP⁺ es captado por el transportador de dopamina (DAT) de las neuronas dopaminérgicas y se deposita en el citoplasma de éstas. El MPP⁺ induce neurotoxicidad principalmente inhibiendo el complejo I de la cadena de transporte de electrones mitocondrial, resultando en agotamiento de ATP y aumento del estrés oxidativo (Meredith & Rademacher, 2012).

La rotenona es un pesticida que se usa con frecuencia para matar insectos y peces molestos en los lagos. Este producto químico se encuentra naturalmente en las plantas del género *Lonchocarpus* que pertenecen a la familia de las leguminosas. Debido a que este es un producto natural, también se ha utilizado en la agricultura orgánica. Debido a que es lipofílico, puede cruzar fácilmente la BHE y entrar en todas las células sin depender de un transportador específico. El mecanismo de toxicidad de la rotenona está mediado principalmente por su potente inhibición del complejo I mitocondrial (Sanders & Greenamyre, 2013).

El paraquat (1,1-Dimetil-4,4-bipiridilo) es un herbicida comúnmente utilizado. La exposición crónica al paraquat, como en el caso de zonas agrícolas, ha sido asociada como un factor de riesgo para el desarrollo de la EP. A pesar de tener una estructura similar al MPP⁺, paraquat muestra diferentes propiedades de transporte y mecanismo de toxicidad. Su capacidad de cruzar la BHE es debido a la vía de transporte de aminoácidos neutros, mientras que la toxicidad del paraquat se produce principalmente en la mitocondria a través del ciclo redox por la generación de ROS (Day, Patel, Calavetta, Chang, & Stamler, 1999; Rodriguez-Rocha, Garcia-Garcia et al., 2012; Shimizu et al., 2001).

3 Justificación

El uso de la terapia génica en enfermedades neurodegenerativas abre un nuevo campo en el tratamiento ya que se puede actuar sobre procesos para los cuales no existen agentes terapéuticos. Numerosos estudios se están enfocando en diversas moléculas terapéuticas, sobre todo en aquellas que tengan una acción neuroprotectora, como el CDNF.

Existen pocos sistemas de CPPs eficientes de envío de moléculas terapéuticas hacia el cerebro. El péptido RVG29 hasta la fecha no se ha utilizado para el envío de DNA como molécula cargo. Se ha demostrado que el cambio de un solo aminoácido en el sitio de unión al AChR de la glucoproteína del virus de la rabia incrementa su virulencia. Por lo que nuestro grupo de investigación logró la expresión de un gen reportero (GFP) en una línea celular de fenotipo neuronal mediante el uso de un péptido RVG29 portando una mutación de asparagina por lisina en el sitio de unión al receptor de acetilcolina (RVG mutante). En este trabajo evaluamos la eficiencia del péptido RVG29m como vehículo para la entrega del gen CDNF en un modelo de la EP.

4 Hipótesis

El péptido RVG mutante es eficiente como transportador del gen CDNF en un modelo animal de EP.

5 Objetivo general

Evaluar la eficiencia del péptido RVG mutante como transportador del gen CDNF en un modelo animal de la EP.

6 Objetivos específicos

1. Determinar la relación óptima de los componentes para formar el complejo RVGm-KP-CDNF.
2. Evaluar el efecto del complejo RVGm-KP-CDNF en la función motora y cognitiva de un modelo animal de la EP.
3. Analizar el efecto del complejo RVGm-KP-CDNF sobre los diferentes tipos celulares en el cerebro en un modelo animal de la EP.

7 Estrategia general

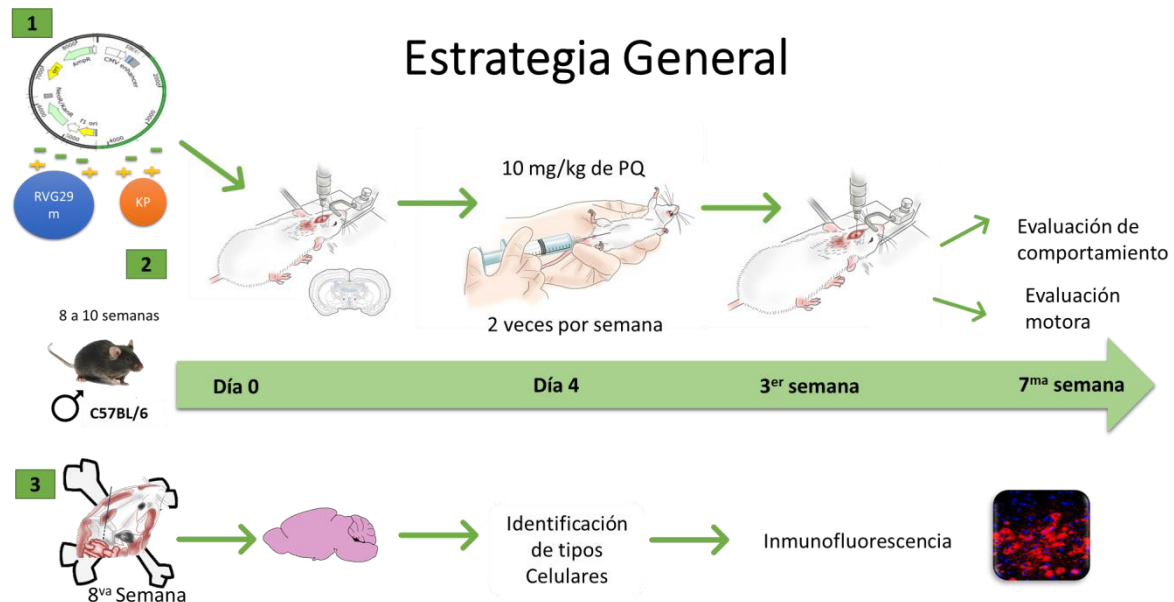


Figura 6. Estrategia general.

8 Materiales

8.1 Material biológico

8.1.1 Péptidos

- mRVG29 (YTIWMPENPRPGTPCDIFTKSRGKRAS-NGGGRRRRRRRRRR)
- péptido cariofílico (KP) (MAPTKRKGSCPGAAPNKKP)

Los 2 péptidos fueron obtenidos de United Peptide Corporation (Herndon, VA, USA).

8.1.2 Animales

32 ratones machos y hembras de la cepa C57BL/6 de 8-10 semanas y fueron mantenidas en ciclos de 12 horas luz/obscuridad bajo libre acceso a comida y agua. Fueron adquiridos de Círculo de ADN SA de CV (Cd. De México). El manejo de los murinos fue acorde a lo descrito por la Norma Mexicana NOM-062-ZOO -1999. Los ensayos *in vivo* fueron evaluados y aprobados por el Comité de Ética de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León bajo el siguiente número de registro: HT17-00005. Para el manejo de los animales se utilizó el anestésico ketamina/xilacina.

8.1.3 Anticuerpos

Los anticuerpos anti-Iba 1 y anti TH fueron obtenidos de Abcam (Cambridge, MA, USA). Los anticuerpos anti-CNPase, anti-GFAP, goat anti-mouse FITC y goat anti-rabbit rhodamine fueron obtenidos de Millipore (Billerica, Massachusetts, USA). DAPI mounting solution fue obtenido de Vector Laboratories, Inc. (Burlingame, CA, USA).

8.2 Reactivos

- Etanol (CTR)

- Parafina (CTR)
- Hematoxilina (sigma-adrich)
- Eosina (sigma-adrich)
- Violeta de cresilo (sigma-adrich)
- Azul luxol rápido (sigma-adrich)
- Carbonato de litio (sigma-adrich)
- Ácido acético glacial ()
- Vecta Shield con DAPI (Vector Laboratories)

8.3 Soluciones

- Agarosa (Sigma-Aldrich) Preparar en TAE 1X.
- Buffer TAE 1X: 40mM Tris, 20mM ácido acético y 1mM EDTA.
- Paraformaldehído (PFA) (Sigma-Aldrich) Preparar en PBS1X
- Paraquat (10 mg/kg)
- PBS 1X: 137 mM NaCl; 2.7 mM KCl; 4.3 mM Na₂HPO₄; 1.47 mM KH₂PO₄. pH 7.2-7.4.
- PBS-Tritón 0.1X: 137 mM NaCl; 2.7 mM KCl; 4.3 mM Na₂HPO₄; 1.47 mM KH₂PO₄; 0.9mM Tritón X-100. pH 7.2-7.4.
- Buffer de citratos: 10mM ácido cítrico; 0.05% Tween 20, pH 6.0.

8.4 Equipo de laboratorio

- Balanza analítica (GR-120, AND)
- Equipo esterotáxico con barras para los oídos de 18° y un adaptador para ratón (Stoelting).
- Material de cirugía y disección (tijeras, pinzas, escalpelo no. 3, navajas no. 15, microtaladro marca Stoelting, pinza gubia para hueso (Stoelting) y equipo para rasurar.
- Bomba de infusión (Stoelting).
- Jeringa de 10 µL (Hamilton serie 900).
- Bomba peristáltica (FH100, Thermo Fisher scientific)

- Micropipetas 1000 µl, 200 µl, 100 µl, 20 µl y 10 µl (Labnet)
- Cámara de electroforesis de geles de agarosa (B1A, Owl Separation Systems, Inc.)
- Transiluminador UV (2000, Bio-Rad)
- Espectrofotómetro (BioPhotometer, Eppendorf)
- Campana de Flujo Laminar Clase II (AH-100, TelStar)
- Termociclador (PTC-100, MJ Research, Inc)
- Fuente de poder (300 Plus, Labnet)
- Vortex (VX-100, Labnet)
- Histoquinete (Kedee)
- Centro de inclusión KD-BM (Kedee)
- Crioplaca KD-BL (Kedee)
- Micrótopo para bloques de parafina (RM2245, Leica)
- Baño de flotación KD-P (Kedee)
- Microscopio de campo claro (DM500, Leica) con cámara Nikon Eclipse 50i (5.0 RTV, Micropublisher)
- Software para conteo manual de células (Cell counter-ImageJ)
- Software para gráficas y análisis estadísticos (Grap Pad Prism 6)

8.5 Consumibles

- Tubos de 50 ml y 15 ml (Corning)
- Tubos Eppendorf de 1.5 µL
- Jeringas de Insulina 0.5 ml y 0.3 ml (BD Ultrafine)
- Algodón plisado 300 g.

9 Metodología

9.1.1 Preparación de los complejos RVG29 y caracterización por geles de retardo

Para la preparación del complejo mRVG29-KP-CDNF fueron preparados y caracterizados para su unión con el plásmido. El complejo RVG29m-KP-CDNF fueron preparados usando 2 µg del plásmido pcDNA-CDNF e incubados a diferentes concentraciones con los péptidos mRVG29 y el KP a las relaciones de 1:0:0, 1:1:0, 1:4:1, 1:2:2,1:1:4, 1:0.5:8, 1:0:16 µg a temperatura ambiente en agitación constante durante 30 min. Después de la incubación, los siete complejos fueron mezclados con buffer de carga y analizados en geles de retardo. Se utilizó electroforesis en geles de agarosa al 1% con bromuro de etidio (0.5 g/mL de el gel). Los geles fueron fotografiados en el equipo DIGI DOC-IT.

9.1.2 Cirugía estereotáxica

Para la cirugía se anestesió a los ratones de la cepa C57BL/6 de 8-10 semanas con 25 ± 2 gr de peso con ketamina/xilacina a una concentración de 80-100 mg/kg y 10-10.5 mg/kg respectivamente. El ratón con una rasuradora se le retiró el pelo del cráneo al ratón, y mediante trepanación craneal se dejó expuesta una región del cerebro. Posteriormente se colocaron en el equipo esterotáxico con barras para los oídos de 18° y un adaptador para ratón. La barra de incisivos a 6 mm por debajo de la línea interaural. Se ajustaron las coordenadas para el cuerpo estriado AP +0.38 mm desde la línea interaural, ML -2 mm desde la línea media y DV -3.12 mm. Después de la trepanación craneal se inyectaron 5 µL del complejo RVGm-KP-CDNF a una velocidad de 0.1 µL/minuto con la bomba de infusión conectada mediante una manguera a una jeringa de 10 µL (Hamilton serie 900) para la microinyección del complejo y del PBS.

9.1.3 Modelo animal de EP con Paraquat

Para establecer el modelo animal de la EP se formaron 4 grupos con 6 ratones cada uno como sigue: Control, CDNF, Paraquat (PQ), CDNF+PQ. 4 días previos a la intoxicación con paraquat y a los 20 días después de iniciado el tratamiento se administró por vía estereotáxica el tratamiento con el complejo RVGm-KP-CDNF. Posteriormente, se administraron 10 mg/kg de PQ a los ratones por vía intraperitoneal dos veces por semana (martes y jueves).

La preparación del stock es una concentración de 100mg/ml se pesa 100 mg de methyl viologen hydrate 98% organics (PQ), se disuelve en 1ml de H₂O miliQ previamente filtrada, para al final al ajustar la concentración se toma 25 µl de PQ +975µl de PBS para obtener un volumen final de 1ml para inyectar al ratón 100 µl. Nota: la preparación y manipulación del PQ se realiza en la campana de flujo laminar.

9.1.4 Evaluación de la función cognitiva

El comportamiento animal se evaluó con base a una prueba en la que se les colocó 5 g de algodón en la jaula de los ratones, para poder evaluar la interacción del ratón con el material de construcción, se calificó la complejidad del nido construido después de 24 horas, como lo indica Hess E, S. et al. 2008 y como se muestra en la tabla 2.

9.1.5 Evaluación de la disfunción motora

Después de 7 semanas de tratamiento, se evaluó la disfunción motora de los ratones mediante una prueba; la cual consta de la postura y el movimiento del ratón fuera de la jaula, en una mesa encerrado en una caja transparente para observar el comportamiento del ratón y poder comparar con el control las características antes mencionadas, con base a esto se obtuvieron puntajes que han sido reportados por Sager et. Al vol. 208.2010 y como se muestra en la tabla 3.

Adicionalmente, se hizo un análisis de marcha, los animales recibieron un entrenamiento donde se habituaron a la prueba en una pista. La pista esta iluminada

en el inicio y al final se encuentra un cuarto oscuro con recompensa. Después del entrenamiento; las patas de los animales a las que previamente se les añadió pintura-no tóxica, se impregnan en un papel blanco que se encuentra en el piso de la pista. Las patas delanteras se pintaron color rojo y las patas traseras se pintaron color negro o azul. Se evaluó la longitud de pasos, longitud de balanceo y longitud de postura.

9.1.6 Obtención de los tejidos

La fijación de los cerebros de los ratones fue con paraformaldehído al 4% mediante la técnica de perfusión cardiaca utilizando una bomba peristáltica. Los ratones fueron anestesiados con Zoletil® a una dosis de 100.0-160.0 mg/kg intraperitoneal. Posteriormente se realizó una incisión a lo largo de toda la longitud de la caja torácica para exponer la cavidad pleural. Después se realizó una incisión en el extremo posterior del ventrículo izquierdo y se pasó una aguja a través de la pared de la aorta, por último, se hizo una incisión en la aurícula derecha con unas tijeras y se conecta la bomba peristáltica para perfundir al animal con 25 ml de PBS 1X frío y después con 25 ml de PFA al 4% (en buffer de fosfato de sodio 0.1 M pH 7.4). Una vez obtenidos y post-fijados los cerebros con PFA al 4% por 12 h, se procede a incluirlos en parafina por medio de la técnica histológica. Una vez incluidas las muestras se realizaron cortes de 5 μ m en un micrótomos semiautomático.

9.1.7 Inmunofluorescencia

Los cortes histológicos se permeabilizaron con 3 lavados de 5 minutos cada uno con PBS-Tritón 0.1% a una temperatura de 100°C por 60 min. Se bloquearon los sitios inespecíficos durante 1 hora con suero de caballo 10% preparado en PBS-Tritón 0.1%. Posteriormente se incubaron con el anticuerpo primario toda la noche, con dilución de anti-TH y anti-GFAP en 1:1000, anti-CNPase y anti-Iba-1 en 1:200. Al finalizar la incubación se realizó 3 lavados de 5 minutos cada uno con PBS-Tritón 0.1% y se incubaron con el anticuerpo secundario diluido en PBS-Tritón 0.1%-suero de caballo 1.5% ó PBS-Tritón 0.1%-suero de caballo 1.0% y BSA 0.1% (dependiendo del anticuerpo) durante 2 horas a temperatura ambiente. Se realizan

3 lavados de 5 minutos cada uno con PBS 1x. Se recolectan y secan los cortes en los portaobjetos y se montarán con VECTASHIELD®.

9.1.8 Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se determina la significancia entre dos grupos con t-student a dos factores y el análisis entre tres o más grupos se realiza con una prueba de ANOVA de un factor seguido de una corrección de Tukey, también se utilizó la prueba paramétrica Kruskal-Wallis mediante el software Graphpad Prism 6.0. Los datos se presentan como media \pm SD. Una $P < 0.05$ se considera como estadísticamente significativo.

10 Resultados

10.1 Relación óptima para la formación del complejo RVG29m-KP-CDNF

Para determinar la relación estequiométrica necesaria para la unión óptima de los componentes del complejo se realizó una mezcla del plásmido pcDNA3.1 que codifica a la proteína CDFN con el péptido RVG29m. y el péptido cariofílico (KP) como señal de localización nuclear para que el plásmido pueda internalizarse de manera eficiente al núcleo. Los componentes se unen mediante cargas electrostáticas opuestas para formar el complejo RVGm-KP-CDNF. Las cargas negativas de los grupos fosfato del DNA interactúan con las cargas positivas de la cadena de argininas de la secuencia del péptido RVG29m, así como con las cargas positivas de los aminoácidos de lisina y arginina que se encuentran en el péptido cariofílico. (figura 7)

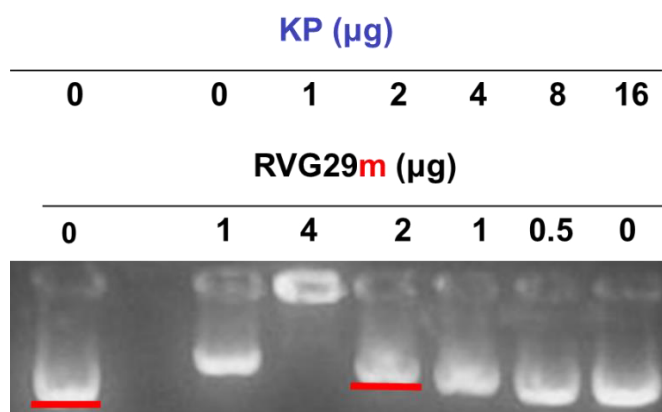


Figura 7 Gel de retardo de agarosa del complejo RVG29m-KP-CDNF.

Para determinar la relación molar óptima se utilizó la misma concentración del plásmido CDFN (2µg) y para calcular la relación de los componentes del complejo se analizaron diferentes concentraciones de los péptidos RVG29m (0-4 µg) y KP (0-16 µg). La relación óptima del complejo fue de 2:2 la cual mostró un retardo en la migración del complejo (señalado en color rojo) con respecto al plásmido con el gen CDFN sin péptidos.

En la primera banda se puede observar la migración del plásmido con el gen CDFN (2 µg). En la segunda banda se observa un retraso de la migración del complejo formado por el plásmido y 1 µg del péptido RVG29m, mientras que a una relación 1:4 los péptidos (KP-RVG29m) junto con el plásmido, el complejo no logra atravesar

los poros de agarosa al formarse una molécula bastante grande. En cambio, en la relación 16:0 se observa que el péptido cariofílico no afecta en la migración del plásmido debido a una secuencia de aminoácidos de menor tamaño que la del péptido RVG29m o una menor afinidad. En contraste, en la relación 2:2 donde están presentes ambos péptidos, se observó un retardo en la migración del complejo, y fue la que se seleccionó para evaluar el efecto del CDNF en un modelo de la EP, mediante su administración estereotáctica. La relación molar óptima es aquella donde se observa mayor retención en el pozo del gel de agarosa.

10.2 El CDNF disminuye la disfunción cognitiva causada por el paraquat

Una vez que se obtuvo la relación óptima del complejo RVG29m-KP-CDNF, se establecieron las coordenadas para su administración en el cuerpo estriado de ratones C57BL/6. Se realizó la cirugía estereotáctica con las especificaciones anteriormente mencionadas, se cargaron 10 µl de tinta azul en una jeringa Hamilton y se infundió en las siguientes coordenadas del cerebro; AP: +.38 mm, ML: -2 mm, DV: -3.12 mm para establecer las coordenadas. Una vez establecidas las coordenadas del cuerpo estriado se realizó la estereotaxia administrando el complejo RVGm-KP-CDNF a los ratones del grupo CDNF y CDNF+PQ. Para establecer el modelo de la EP, al cuarto día postcirugía, se les administró paraquat (10mg/kg) por vía intraperitoneal (i.p.) a lo largo de 6 semanas con una frecuencia de dos veces a la semana, mientras que al grupo control se le administró PBS. Se realizó una segunda cirugía estereotáctica en la tercera semana,

Al término de la sexta semana se realizaron pruebas para evaluar cambios en la función cognitiva y motora. Uno de los síntomas no motores que se presenta en la EP debido al daño causado en la vía mesolímbica y mesocortical es la disfunción cognitiva. Para lo cual se evaluó el comportamiento de los ratones en base a la construcción del nido como se muestra en la tabla 2.

Tabla 2. Sistema de puntuación de la construcción del nido con algodón.
(Hess et al., 2008)

Descripción del material del nido	Puntos
EL material no fue movido del lugar y no presenta signos de manipulación	0
Se observa interacción con el material (masticado o esparcido por la caja)	1
Nido plano: el material fue reunido para formar un sitio de anidación sin la formación de paredes.	2
• Nido plano con 1 lado que es menos de la mitad de una esfera.	2.25
• Nido plano con 2 lados que son menos de la mitad de una esfera	2.50
• Nido plano con 3 lados que son menos de la mitad de una esfera.	2.75
Copa: el nido tiene paredes identificables que dan la apariencia de poca profundidad.	3
• Nido en forma de copa con 1 lado que es la mitad de una esfera.	3.25
• Nido en forma de copa con 2 lados que son la mitad de una esfera.	3.50
• Nido en forma de copa con 3 lados que son la mitad de una esfera.	3.75
Domo incompleto: las paredes del nido alcanzan el punto más ancho de una esfera imaginaria.	4
• Domo incompleto con 1 lado más alto que la mitad de una esfera.	4.25
• Domo incompleto con 2 lados más alto que la mitad de una esfera.	4.50
• Domo incompleto con 3 lados más alto que la mitad de una esfera.	4.75
Domo completo. Las paredes encierran completamente el hueco del nido. Se puede encontrar un agujero de salida en el costado o en la superficie del domo.	5

Esta prueba utiliza una escala del 0 al 5 siendo el máximo puntaje de 5, que es equiparable a un comportamiento normal por la elaboración del nido con forma de domo completo, mientras que los valores inferiores corresponderían a un grado de comportamiento anormal con la formación de nidos menos complejos e incompletos, teniendo de referencia la figura 8A.

Para realizar esta evaluación se colocaron 5 gramos de algodón en las jaulas de los ratones como material de construcción y se evaluó, la capacidad de éstos de formar un nido y el modo en que lo construyeron.

El grupo control construyó un nido bien organizado en forma de domo completo, registrándose un comportamiento similar en los ratones del grupo CDNF. Sin embargo, los ratones del grupo PQ al tener neurodegeneración y daño en el sistema dopaminérgico mesencefálico, no lograron construir un nido en forma de domo, sino nidos desorganizados e incompletos en forma de copa o planos. Mientras que el grupo CDNF+PQ logró construir nidos en forma de domo incompleto o copa, resultando en una menor disfunción cognitiva que la de los ratones tratados con PQ como se puede apreciar en la figura 8B.

Por lo que la función cognitiva está siendo claramente afectado por el PQ, pero cuando se añade el tratamiento de CDNF protege a las neuronas del daño causado por el paraquat, tal como se observa en la figura 8C, donde existe una tendencia en recuperar la función cognitiva en el tratamiento de CDNF+PQ.

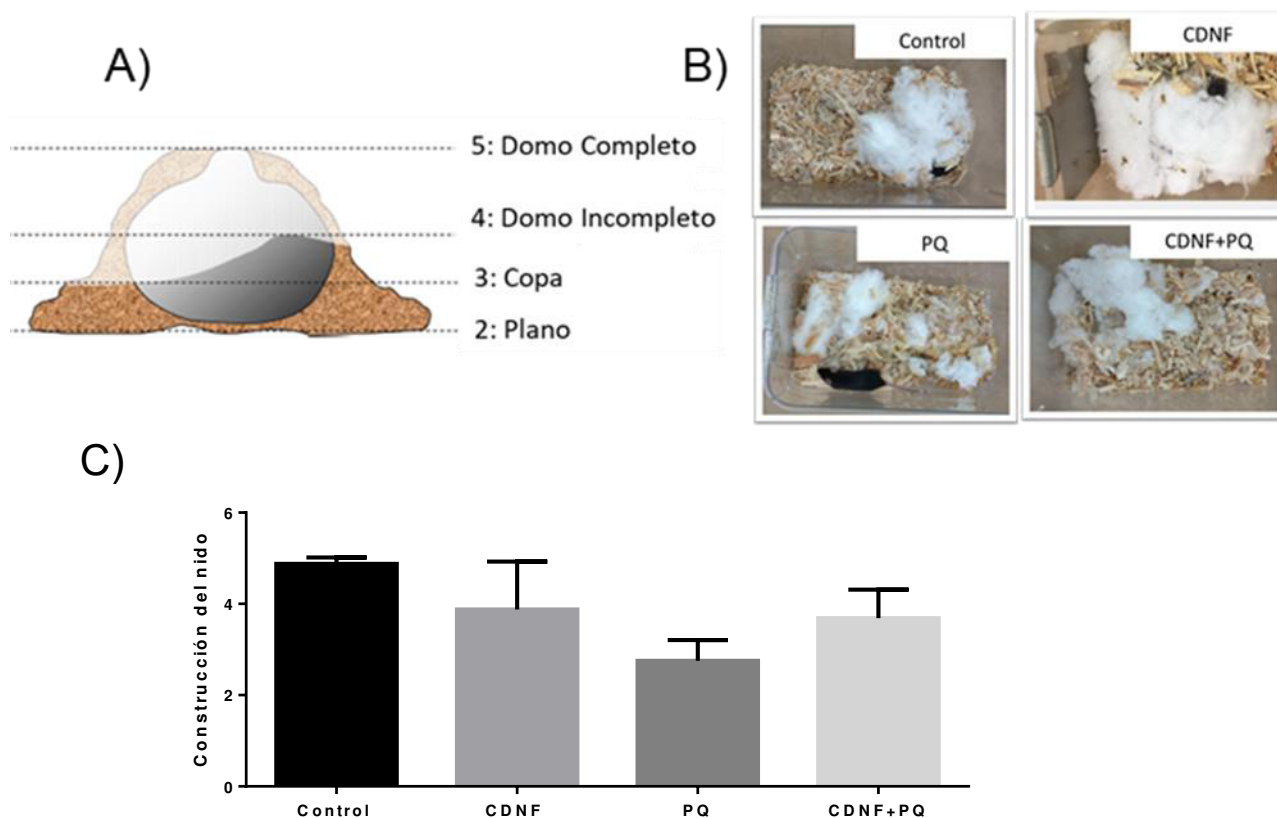


Figura 8 Evaluación del comportamiento.

A) Representación esquemática del sistema de puntuación de la construcción del nido. Tomado de Hess et.al. 2008 B) Imágenes representativas de los nidos construidos. El comportamiento de los ratones fue evaluado individualmente, a los cuales se les colocaron 5g de algodón. C) Representación gráfica de los puntajes de los nidos construidos. Se utilizó la prueba paramétrica de ANOVA de un factor.

10.3 El CDNF disminuye la disfunción motora causada por el paraquat

Una de las características de la EP es la pérdida de la coordinación motora, debido a la pérdida de neuronas dopaminérgicas en la vía nigroestriatal que está involucrada en el control músculo esquelético, por lo que evaluamos si la función motora de los ratones de cada uno de los grupos presentaba alguna alteración.

Se evaluó la postura y el movimiento de los ratones y se asignó un valor en una escala del 0 al 2 en cada criterio como se muestra en la tabla 3. Para indicar el grado de la disfunción motora se sumó el puntaje tanto de la postura como del movimiento teniendo un rango del 0 al 4.

Tabla 3. Criterios de evaluación de la postura y movimiento.
(Kirchhoff, Mörk, Brennum, & Sager, 2009)

Criterios de evaluación	
Postura	
Puntaje	Descripción
0	Normal
1	Ligeramente anormal
2	Severamente anormal
Movimiento	
0	Normal
1	Ligeramente anormal
2	Severamente anormal

Los ratones del grupo control presentaron una postura y movimiento normales al caminar, mientras que en los del grupo CDFN la postura fue ligeramente anormal con movimiento normal. Por otro lado, el grupo con PQ mostró una postura flexionada, un movimiento más lento al caminar, alzando notablemente las patas traseras, pero haciendo pasos cortos con éstas y en casos muy particulares de este grupo se observó temblor, uno de los principales síntomas de la EP, por lo tanto, se ve disminuida la función motora en este grupo. Mientras que en el grupo CDFN+PQ la función motora no fue afectada por el PQ, existiendo una tendencia de rescatar la función motora que se encontró afectada en el grupo PQ, y observamos un movimiento ligeramente anormal pero una postura normal, como se aprecia en la figura 9.

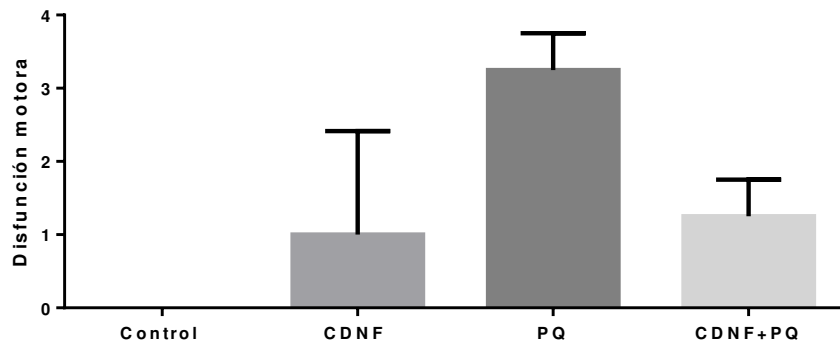


Figura 9. Evaluación de la función motora.

Durante la 7^{ma} semana se evaluó la función motora de los ratones en base a la postura y el movimiento. Las barras representan el promedio de la sumatoria de ambos criterios de evaluación. Se utilizó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis.

Como se ha mencionado la disfunción motora es el principal problema de la EP, para confirmar los resultados obtenidos en la prueba anterior se realizó un análisis de la marcha, que es una herramienta sensitiva para examinar la locomoción y la coordinación de las extremidades en roedores pequeños. El análisis consiste en que el ratón, con las patas delanteras y traseras impregnadas con tinta de color rojo y negro, respectivamente, atraviese un túnel recto cubierto con cartulina en donde se imprimen o capturan las huellas al caminar, y se evalúa la base de soporte y el caminar de cada ratón.

Para determinar su función motora, se midió la distancia que recorren las patas de cada ratón, adquiriendo la longitud de balanceo, de paso y postura como se muestra en la figura 10. (BS) Base de soporte (Girirajan et al., 2008).

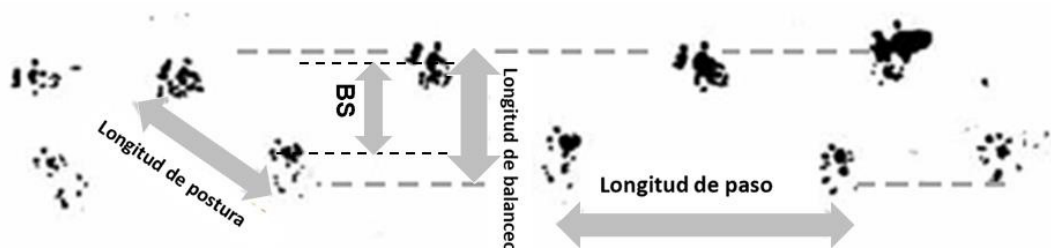
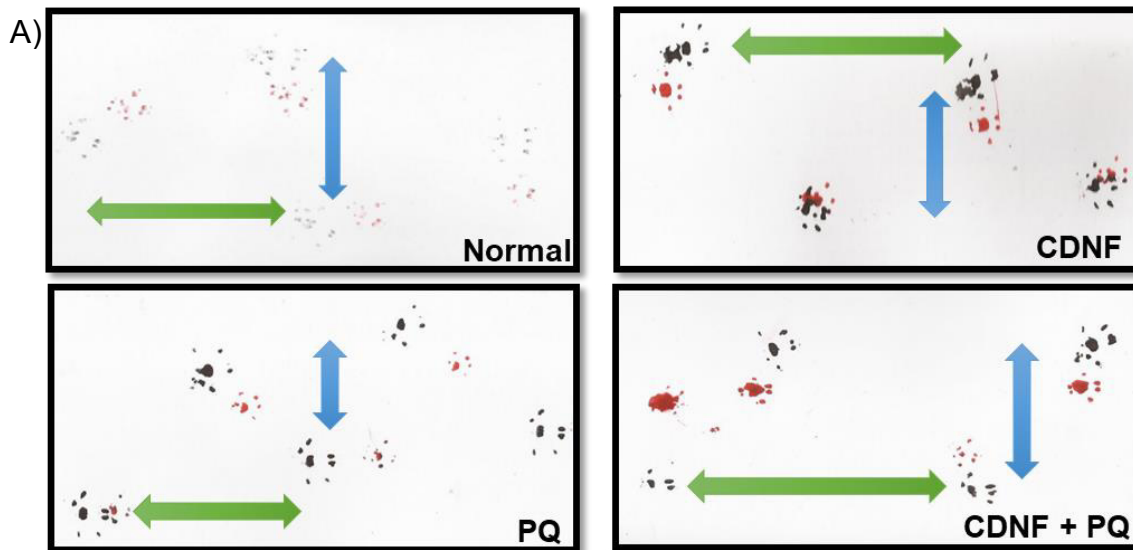


Figura 10. Representación gráfica de los parámetros seleccionados para el análisis de la marcha.

En la figura 11A se puede observar como la longitud entre los pasos del grupo control es mayor que la del grupo con PQ, mientras que el grupo CDNF es semejante al control. Por otro lado, en el grupo CDNF+PQ, la longitud del paso es mayor que en el grupo con PQ, semejante al control y al de CDNF. Este patrón se observa igualmente en la longitud de balance y longitud de postura. Sin embargo, en la base de soporte delantero el grupo CDNF muestra una mayor distancia entre sus extremidades delanteras, de la misma manera que el grupo con PQ. En contraste, en el grupo control hay una menor distancia en la base de soporte delantero, mientras que el grupo CDNF+PQ tuvo un comportamiento similar al grupo control, y se observó una diferencia significativa entre el PQ y el CDNF+PQ como se muestra en el análisis estadístico en la figura 11B.



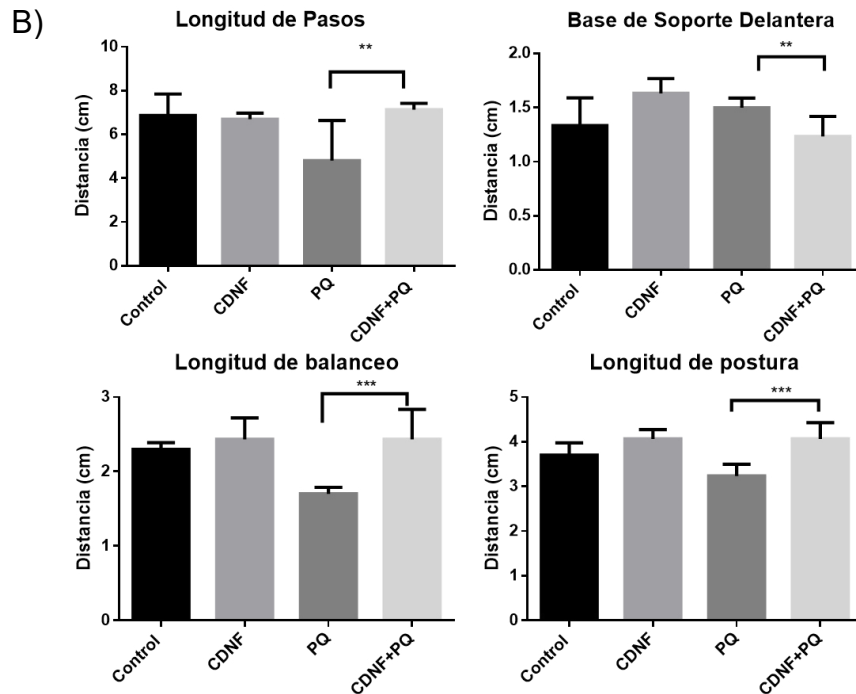


Figura 11. Evaluación de la función motora con el análisis de marcha.

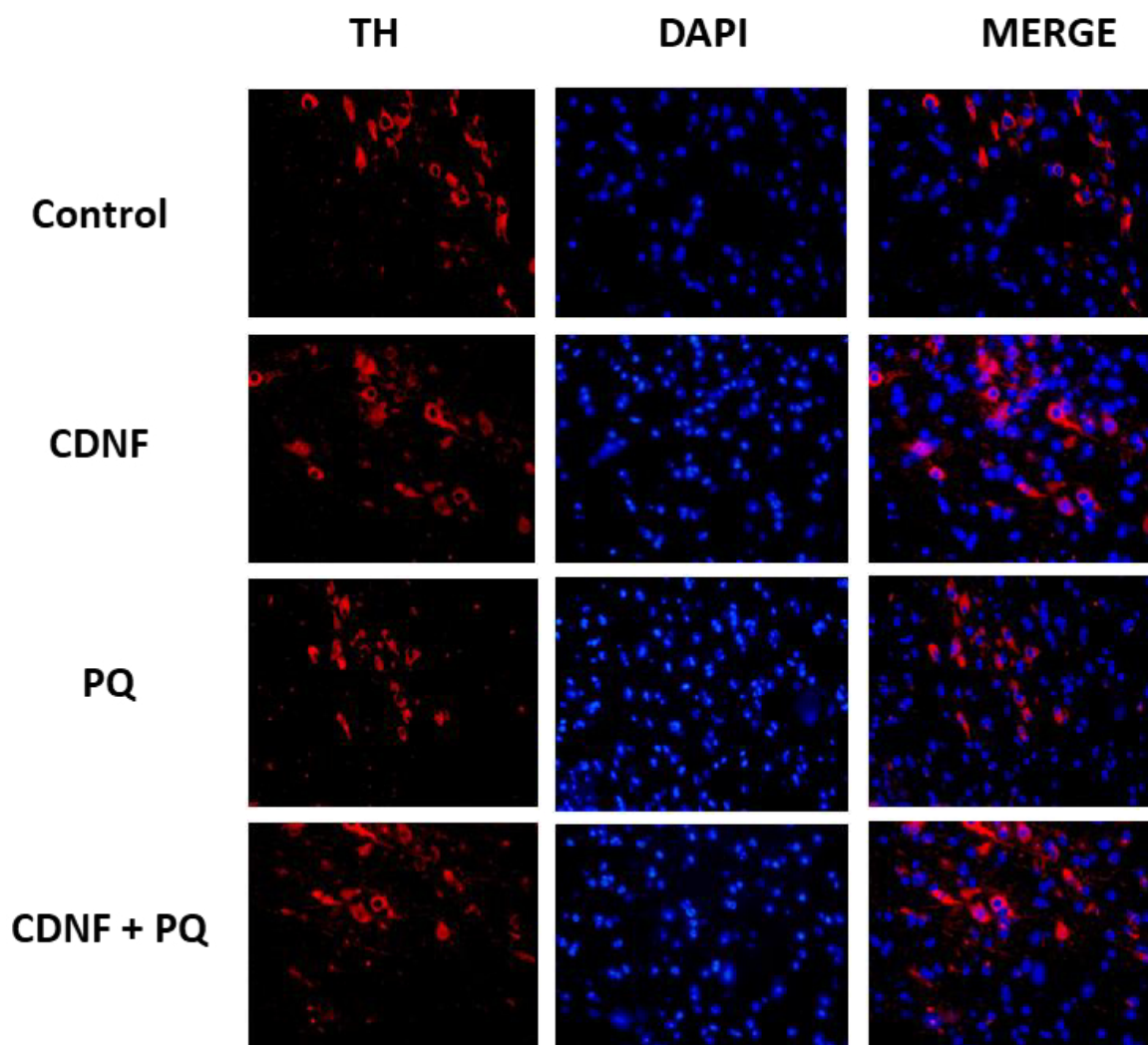
A) Imágenes representativas de las huellas de cada grupo, en color negro se muestran las patas traseras y en color rojo las patas delanteras, se midió la distancia de cada paso para evaluar la longitud de balanceo (azul) y longitud de pasos (verde). B) Representación gráfica del análisis estadístico de cada criterio de la distancia recorrida en cm por los ratones. Se utilizó la prueba paramétrica de ANOVA de un factor con múltiples comparaciones utilizando la prueba de Tukey *P <0.005, *P <0.001, ***P <0.001.

10.4 El CDNF protege a las neuronas dopaminérgicas del daño causado por el paraquat

Una de las principales características de la EP es la pérdida de las neuronas dopaminérgicas en la SN. Por lo que el modelo de la EP debe de cumplir con este principal requisito para fundamentar el daño motor y cognitivo observado. Por esta razón los murinos fueron sacrificados en la 8va semana, y se realizaron cortes del cerebro hasta llegar a la SNpc. Posteriormente se identificaron las neuronas dopaminérgicas mediante el marcador característico tirosina hidroxilasa (TH), ya que es la enzima responsable de catalizar la conversión de L-tirosina a DOPA precursor de la dopamina.

En la figura 12 se muestra la detección de las neuronas dopaminérgicas mediante el marcador TH en la región de la SNpc. La expresión de TH en el grupo control se observa en estado basal las DAérgicas, debido a que no muestra lesión, el grupo CDNF se aprecia una cantidad ligeramente por encima del control. En contraste el grupo PQ se nota una disminución de la DAérgicas por el daño causado con la neurotoxina, lo que nos indica la muerte de las neuronas. El grupo CDNF-PQ es semejante al control, lo que nos indica que nuestro tratamiento tiene un efecto neuroprotector al inhibir el deterioro de estas neuronas.

A)



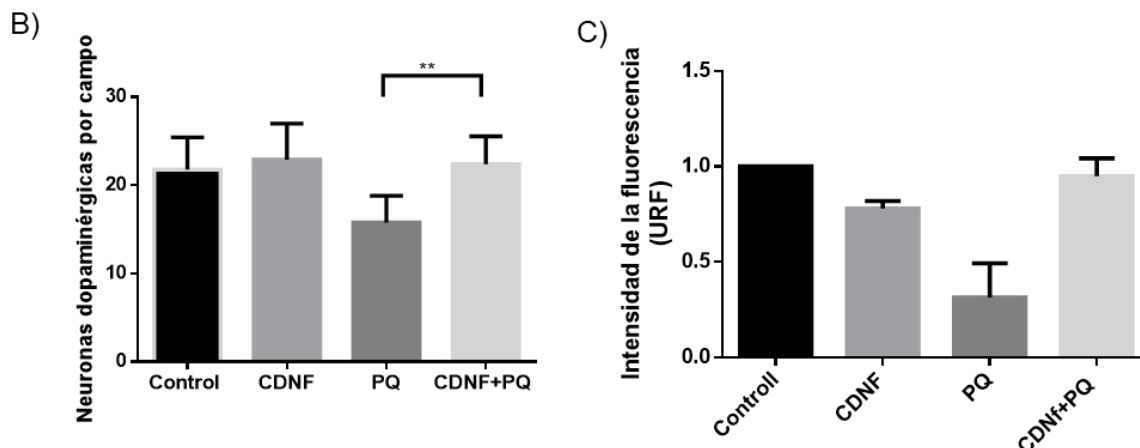


Figura 12. El complejo RVG29m-KP-CDNF protege las neuronas dopaminérgicas del daño causado por el paraquat.

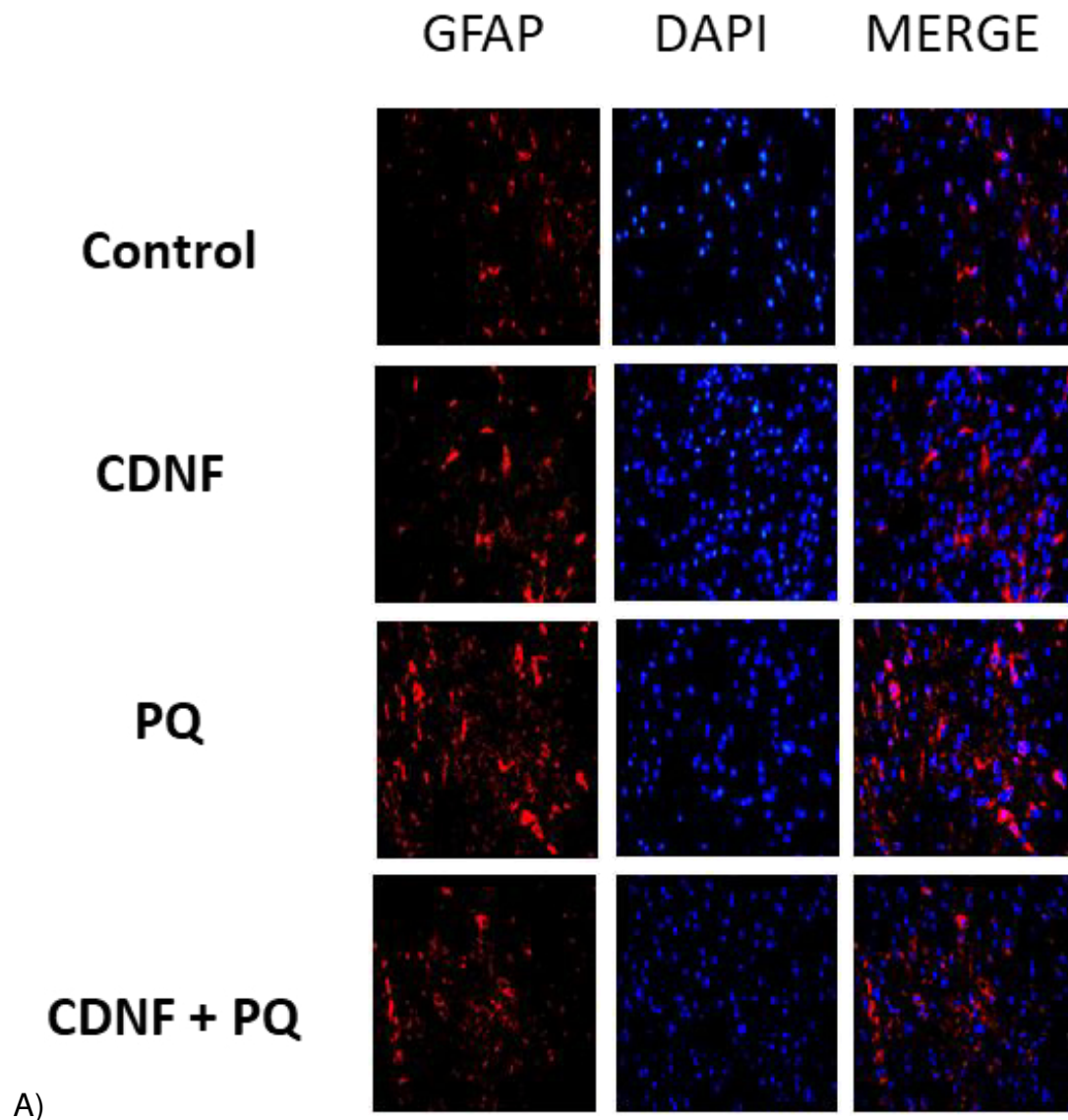
A) Detección de neuronas dopaminérgicas mediante IF con un anticuerpo anti-TH (rojo). Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). En la tercera columna se observa la colocación de las imágenes. B) Cuantificación de las neuronas dopaminérgicas por campos (n=8). C) Unidad de la fluorescencia relativa (URF) de las neuronas dopaminérgicas. El análisis se realizó por medio del Software Graphpad. Cada barra representa la Media \pm SD, *P< 0.05. Escala 50 μ m.

10.5 El CDNF inhibe la proliferación de astrocitos (astroglisis) inducida por el paraquat

Los astrocitos responden a toda forma de daño y enfermedad en el SNC con una variedad de cambios en la expresión génica, estructura y función celular. Al proceso de respuesta de los astrocitos, en el que se incrementa de manera anormal su población celular se le denomina astroglisis (astrocitos reactivados). Para evaluar si el daño causado con el PQ tenía efecto sobre los astrocitos, se realizó una inmunofluorescencia (IF) para marcar a los astrocitos con un anticuerpo que reconoce el epítipo de la proteína ácida fibrilar glial (GFAP), que forma parte de los filamentos intermedios del citoesqueleto de los astrocitos.

En la figura 13 se aprecia la detección de astrocitos mediante IF con el marcador GFAP en cortes sagitales de cerebros de ratón obtenidos de los grupos de estudio. La expresión de GFAP en el grupo control se observa una expresión basal indicando de esta manera la cantidad de astrocitos normalmente, el grupo CDNF tuvo una

expresión semejante al control. Mientras que en el grupo PQ, la expresión de GFAP se incrementó, lo que indica la formación de la cicatriz glial (astroglisis), en contraste con el grupo CDNF+PQ la expresión es similar que el control indicando que tuvo un efecto inhibitorio en la activación de los astrocitos, debido a la neuroprotección por el CDNF.



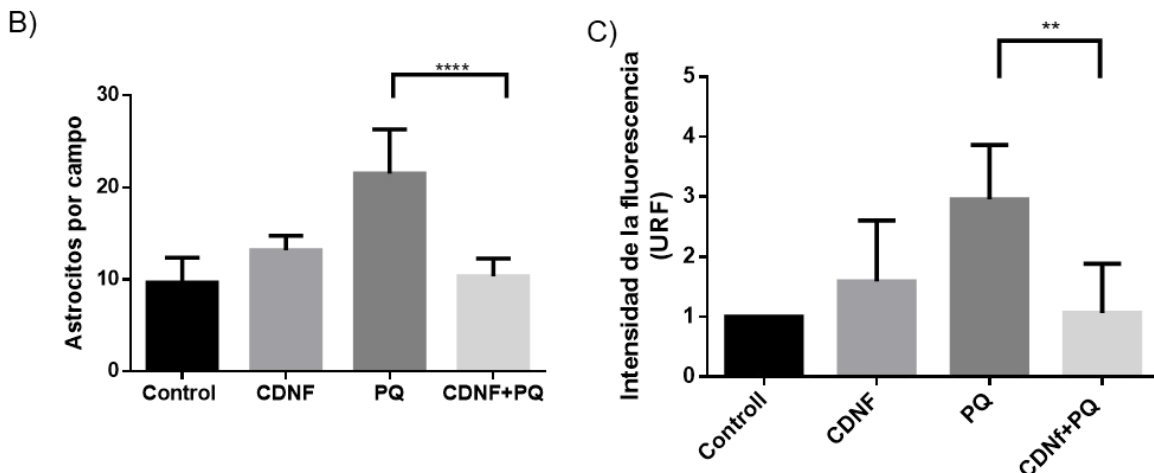


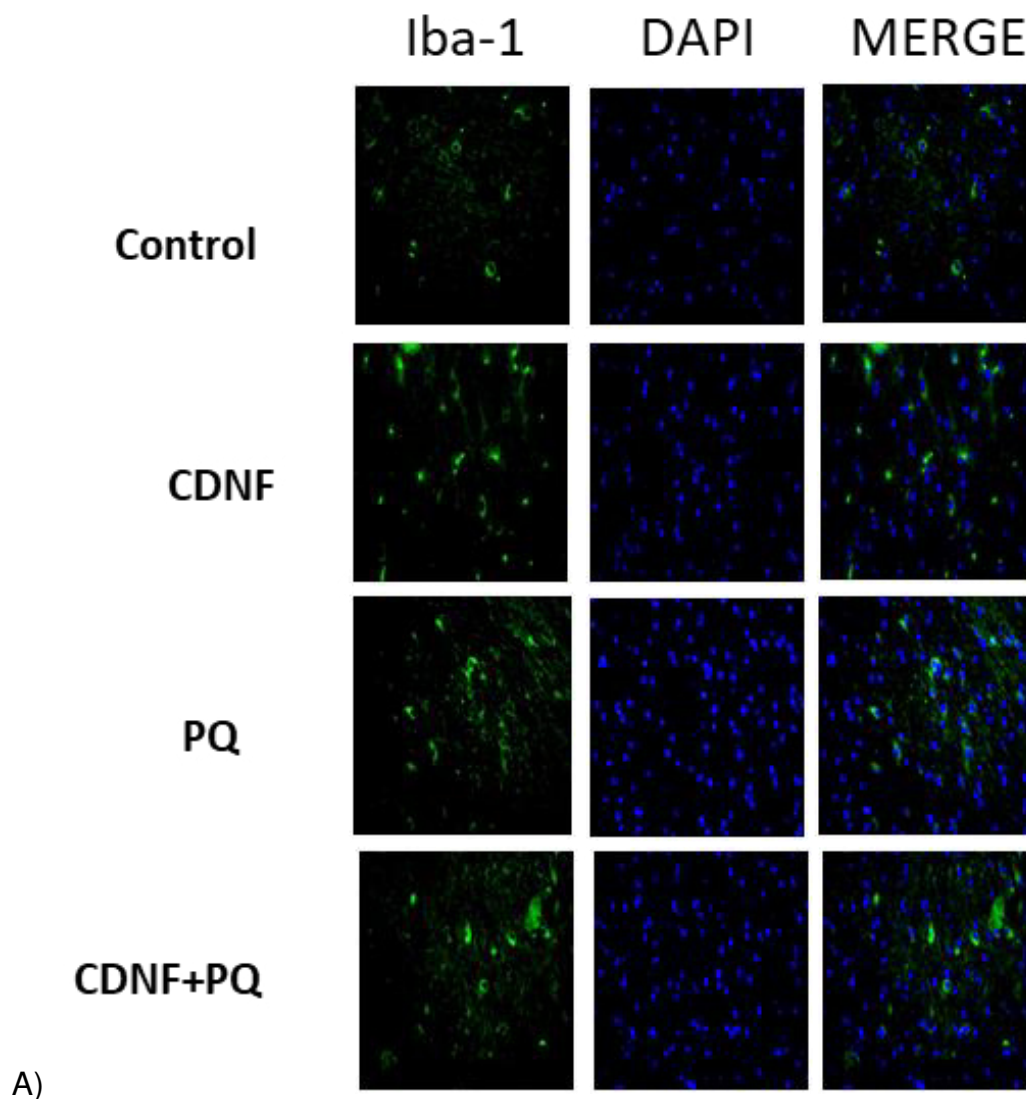
Figura 13. El complejo RVG29m-KP-CDNF inhibe la proliferación de astrocitos (astroglisis).

A) Detección de astrocitos en la SNpc mediante IF con el anticuerpo anti-GFAP (rojo). Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). En la tercera columna se observa la colocalización de las imágenes, donde se aprecian los niveles basales de astrocitos en la SN del cerebro murino en el grupo control. B) Efecto inhibitorio del CDNF sobre la activación de astrocitos. En la cuantificación de los astrocitos por campos (n=8), hay una diferencia significativa entre los grupos CDNF+PQ y el grupo PQ, debido al daño que causado por el PQ, los astrocitos se activan. C) Unidad de la fluorescencia relativa (URF) de los astrocitos. El análisis se realizó por medio del Software ImageJ. Cada barra representa la Media \pm SD, *P< 0.05. Escala 50 μ m.

10.6 El CDNF inhibe la activación de la microglía inducida por el paraquat

Otro tipo celular que se activa cuando hay daño en el SNC es la microglía, que en estado de reposo responde en cuestión de minutos ante los trastornos producidos en su microentorno y fagocita a las células lesionadas. A esta respuesta se le denomina “activación de microglía” o microgliosis. Para evaluar si se presentaba este fenómeno, se realizó una IF para marcar las células de la microglía con el anticuerpo anti-Iba-1. Este anticuerpo reconoce el epítipo de la molécula adaptadora de unión a calcio ionizada 1 (Iba-1), que es una proteína de unión al calcio específica de la microglía activada.

En la figura 14 se observa la detección de células de la microglía mediante IF con el anticuerpo anti-Iba-1 en cortes sagitales de cerebros de ratón obtenidos de los grupos de estudio. La expresión de Iba-1 en el grupo control se observa en estado basal debido a que no se encuentra lesionado, en el grupo de CDNF se aprecia un ligero incremento de expresión en comparación al control. El grupo PQ la expresión de Iba-1 se incrementó, lo que indica que hay una respuesta de las células de la microglía a la lesión ocasionada por el PQ. En el grupo CDNF + PQ el número de microglía es muy similar al control, indicando un efecto inhibitorio de la activación de la microglía.



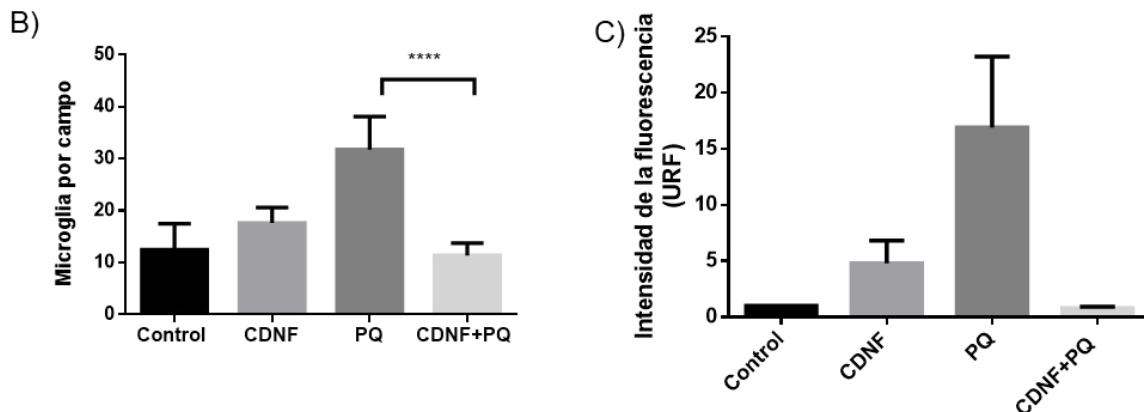


Figura 14. El complejo RVG29m-KP-CDNF inhibe la activación de la microglía (microgliosis).

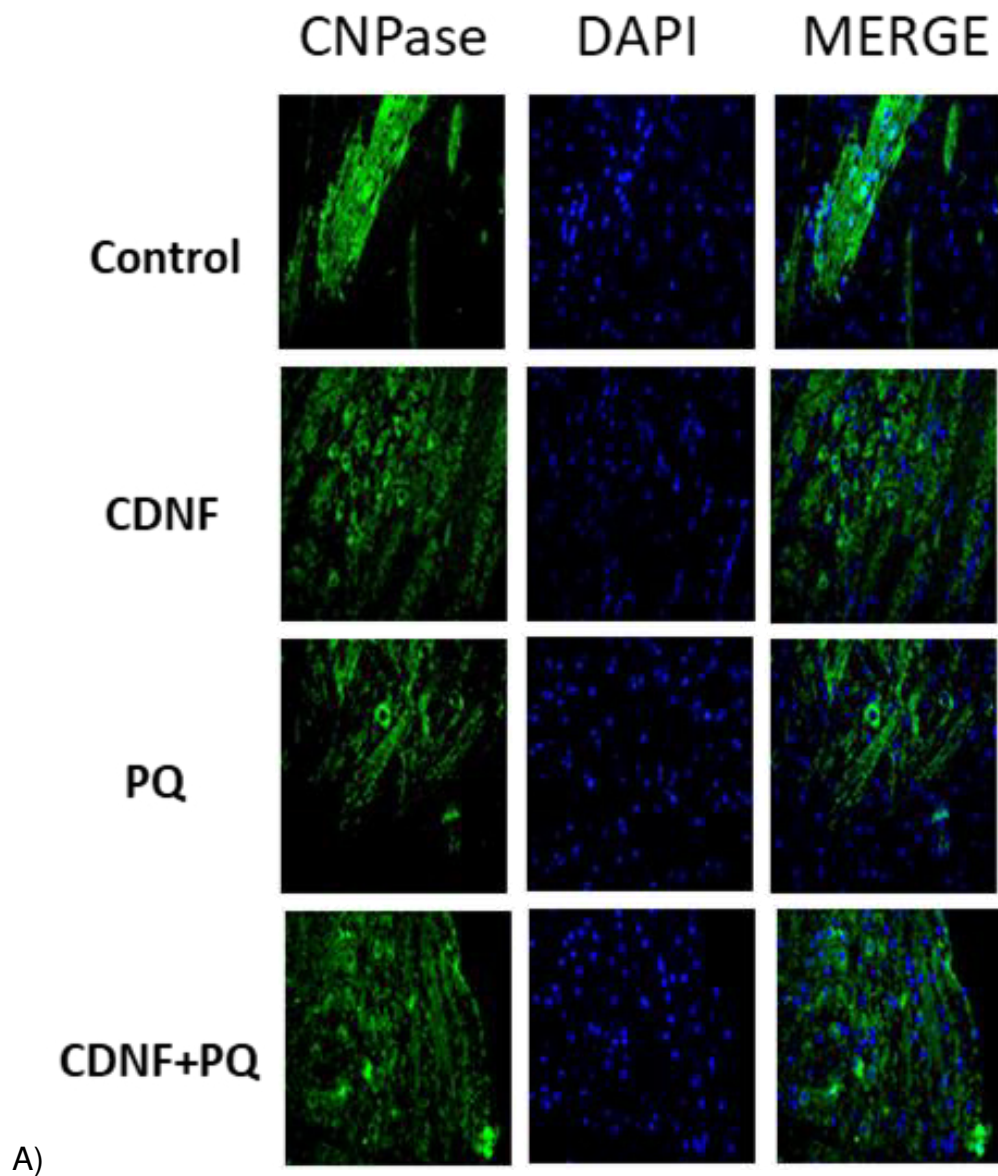
A) Detección de microglía en la SN de cortes sagitales de cerebro murino mediante IF marcando con un anticuerpo anti-Iba-1 (verde). Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). En la tercera columna se observa la colocación de las imágenes. B) Efecto inhibitorio del CDNF sobre la activación de microglía. En la cuantificación de la microglía por campos (n=8), hay una diferencia significativa entre los grupos CDNF+PQ y el grupo PQ debido al daño que causado con el PQ, la microglía se activa, mientras con CDNF+PQ es semejante al control. C) Unidad de la fluorescencia relativa (URF) de la microglía. El análisis se realizó por medio del Software Graphpad Cada barra representa la Media \pm SD, *P< 0.05. Escala 50 μ m.

10.7 El CDNF protege a los oligodendrocitos del daño causado por el paraquat

Para observar el efecto del complejo RVGm-KP-CDNF sobre otro tipo celular importante como lo son los oligodendrocitos, que son los encargados de la formación y mantenimiento de la mielina en el SNC se evaluó su efecto sobre esta población mediante IF con un anticuerpo que reconoce el epítipo de la enzima de mielina anclada a membrana 2',3'-nucleotido cíclico 3'-fosfodiesterasa (CNPase).

En la figura 15 se observa la detección de los oligodendrocitos mediante IF con el anticuerpo anti-CNPase en cortes sagitales de cerebros de ratón obtenidos de los grupos de estudio. La positividad para CNPase en los grupos control es en estado basal con gran número de oligodendrocitos, en el grupo CDNF la cantidad disminuye ligeramente en comparación al control. En el grupo PQ la positividad para

CNPase disminuyó en los ratones tratados con la neurotoxina lo que indica que el daño producido con el PQ disminuye en la población de oligodendrocitos. El grupo CDNF+ PQ presenta una expresión muy similar al control, indicando que hay un efecto neuroprotector del CDNF al mantenerse la población de los oligodendrocitos.



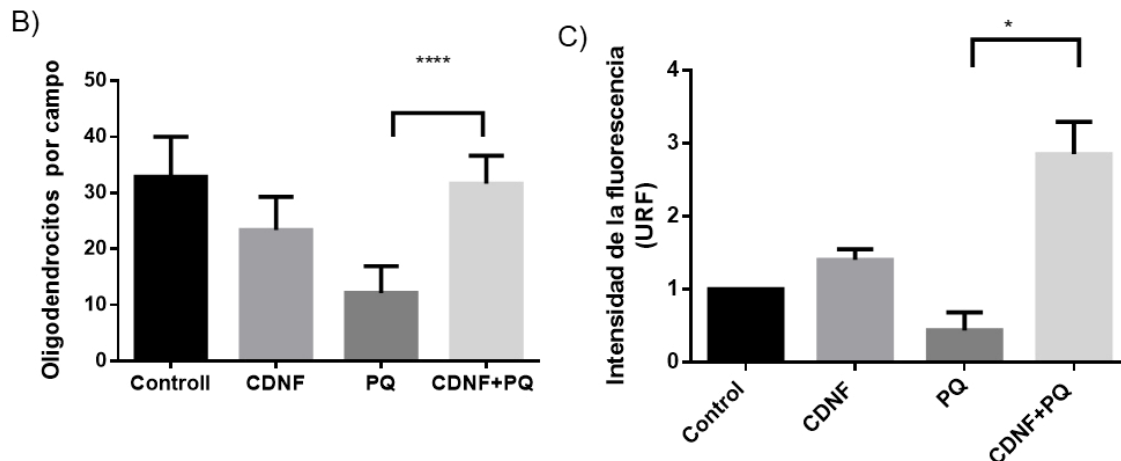


Figura 15. El complejo RVG29m-KP-CDNF protege a los oligodendrocitos de la muerte causada con el paraquat.

A) Detección de oligodendrocitos en la sustancia negra de cortes sagitales de cerebro murino mediante IF marcando con un anticuerpo anti-CNPase (verde). Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul) y en la tercera columna se observa la colocación de las imágenes. B) Efecto neuroprotector del CDNF sobre los oligodendrocitos, cuantificación de los oligodendrocitos por campos (n=8), entre los grupos CDNF+PQ y el grupo PQ hay una diferencia significativa debido a la disminución de los oligodendrocitos, que provoca el PQ por la muerte de neuronas. C) Unidad de la fluorescencia relativa (URF) de los oligodendrocitos. El análisis se realizó por medio del Software Graphpad. Cada barra representa la Media \pm SD, *P < 0.05. Escala 50 μ m.

11 Discusión

La etiología de la EP aún se desconoce, de allí la importancia de contar con un modelo animal para la EP que presente las principales características motoras y no motoras de este padecimiento para lograr un mejor entendimiento (Wirdefeldt, Adami, Cole, Trichopoulos, Mandel, et al., 2011). El 90% de los casos de la EP provienen de una condición esporádica, por lo tanto, se escogió la neurotoxina Paraquat (un herbicida) por su capacidad de atravesar la BHE y de provocar la muerte de neuronas dopaminérgicas por estrés oxidativo, como un causante no genético capaz de reproducir lo padecido por pacientes con EP. El estrés oxidativo provoca peroxidación lipídica, modificaciones en la estructura de proteínas, modificaciones en el DNA, y si este daño no es reparado, culmina en muerte celular y por ende el daño es irreversible (Rodriguez-Rocha, Garcia Garcia , 2012).

Uno de los tratamientos de la EP es la Levo-DOPA, un precursor de la dopamina, que puede atravesar la BHE tras ser administrada por vía oral, aliviando por cortos periodos de tiempo los síntomas de la EP, sin embargo, no evita la pérdida progresiva de las neuronas dopaminérgicas (Alexander, 2004). El uso de las neurotrofinas es una de las terapias más promisorias para inhibir la pérdida de dichas neuronas (Harris & Jenner, 2012). El modelo animal de la EP nos permite evaluar la terapia génica con nuevos sistemas de entrega, que utilizan vectores no virales, para evitar problemas de inmunogenicidad, citotoxicidad y el riesgo de generar mutagénesis y oncogénesis en el huésped (Sullivan & O’Keeffe, 2016).

En este trabajo proponemos el uso de CPPs, los cuales han atraído la atención debido a su capacidad de penetración celular, sin afectar la integridad celular y sin problemas de inmunogenicidad para la entrega de genes al cerebro (Huang et al., 2015). Se ha descrito que el péptido RVG29 tiene capacidad de cruzar la BHE, además de servir como vehículo de entrega para terapia génica (Kumar et al., 2007). Por otro lado, uno de los factores neurotróficos que se ha utilizado en terapia génica en modelos de la EP en murinos, es el CDNF, el principal efecto de este factor es protección de neuronas dopaminérgicas, pero hay indicios que participa en reacciones anti-inflamatorias (Back et al., 2013; Ren et al., 2013). Por esta razón se utilizó en terapia génica para la EP siendo entregado por primera vez a través del CPP RVG29m. Se logró demostrar la capacidad de transfección celular del complejo RVGm con la relación de sus componentes 2:2:2 (pCDNF:RVGm:KP). Demostrando la habilidad del péptido RVGm para transfectar células en el cerebro murino que poseen AChR y manteniendo la estabilidad del pDNA para su importación al núcleo por la NLS (KP).

Este sistema de entrega es un complejo que se une mediante cargas electrostáticas opuestas, debido a que el vector de expresión del gen CDFN tiene cargas negativas que interactúan con las cargas positivas de los péptidos RVGm y KP. El péptido RVG29m, que en su secuencia contiene una gran cantidad de argininas otorgando una carga positiva y debido a la adición de una secuencia de poli-Arg se incrementa dicha unión electrostática. (Herce et al., 2009).

Los ácidos nucleicos no son cariofílicos, por lo tanto, se requiere la adición de un péptido cariofílico como NLS para lograr la importación del pDNA al núcleo. El péptido KP no solo facilita la entrada nuclear del pDNA, sino también le confiere estabilidad evitando su degradación por nucleasas que se encuentren en el citoplasma de la célula, resultando en una mayor eficiencia en la expresión del gen (Pérez-Martínez et al., 2011).

En este estudio se realizó la entrega del gen CDFN con el péptido RVG29 mutante, el cual se ha reportado tener mayor eficiencia al intercambiar la Asn194 con Lys194 en el sitio de unión al AChR, demostrando que un único cambio de aminoácido incrementa la capacidad de transfección celular (Villa-Cedillo et al., 2017). La especificidad del RVG por el AChR, es debido a que la glucoproteína se encuentra en la superficie del virus e interactúa con nAChR, permitiendo la internalización del péptido por esta vía, aunque además se cree que se involucra el receptor GABA (Huey & Hawthorne, 2016). Por este motivo, el complejo RVG29m-KP-CDFN tiene efecto sobre las células gliales, que se ha reportado que expresan el AChR (De Angelis, Bernardo, Magnaghi, Minghetti, & Tata, 2012) y las neuronas dopaminérgicas tienen ambos receptores GABA, que como se mencionó también se cree que esté involucrado en la captación del RVG (Tepper & Lee, 2007). De igual manera se ha reportado que el CDFN es transportado de manera selectiva siendo endocitado y transportado de manera retrógrada del cuerpo estriado hacia la SN (Mätlik et al., 2017; Ren et al., 2013).

En nuestro modelo animal de la EP, los ratones que fueron tratados solamente con PQ presentaron una disfunción cognitiva, debido al daño causado en la vía mesolímbica involucrada en la cognición (Moore & Puri, 2012), y elaboraron nidos desorganizados e incompletos en forma de copa o planos. Mientras el grupo CDFN+PQ logró formar nidos en forma de domo incompleto y copa, resultando de una menor disfunción cognitiva que los ratones tratados con PQ. Mientras que el grupo control no tuvo problema en la formación de un nido con forma de domo. En un modelo animal de la EP inducido por PQ, donde se evaluó el comportamiento de los ratones mediante la formación de nidos, se observó que la disfunción cognitiva

está correlacionada con la muerte de las neuronas dopaminérgicas (Ramírez, 2016).

La disfunción motora también se expresó claramente en este modelo animal, como se observa en la figura 9, el grupo tratado con PQ tuvo una disfunción motora debido a la pérdida de neuronas dopaminérgicas en la vía nigroestriatal involucrada en movimiento músculo-esquelético (Austin et al., 2010), mientras que aquellos ratones que fueron tratados con CDNF la tendencia fue la disminución de la disfunción motora inducida por PQ, por la capacidad de CDNF en la protección de neuronas dopaminérgicas mesencefálicas demostrada previamente (Lindholm et al., 2007). Estudios recientes han demostrado que la administración de CDNF en el estriado de un modelo murino de 6-OHDA por medio de un AAV2 recombinante, produce una recuperación significativa de las neuronas dopaminérgicas de la SN, lo cual se relaciona con nuestros resultados (Ren et al., 2013).

Una herramienta que provee mayor sensibilidad para medir la disfunción motora, ya que examina la locomoción y la coordinación de las extremidades, permitiendo una caracterización más cuantitativamente, es el análisis de la marcha. Sin embargo, la mayor parte de estos trabajos se han llevado a cabo en ratas. En estudios realizados con ratas se encontraron parámetros alterados de la marcha, lo que indica que el análisis de la marcha es un método factible para modelos animales con problemas motores, por derrame cerebral, en el síndrome Smith Magenis y en enfermedades neurodegenerativas como la neuroferritinopatía (Capoccia et al., 2015; Girirajan et al., 2008; Hetze, Römer, Teufelhart, Meisel, & Engel, 2012).

El grupo de PQ fue incapaz de extender las patas a la longitud de pasos del grupo control, debido al daño a las neuronas dopaminérgicas, pero esto no se ve reflejado en los grupos tratados con el CDNF, ya que les confiere protección a las neuronas. La marcha anormal que presentaba el PQ en la longitud de pasos, de balanceo y de postura, se debe al deterioro específico causando un déficit motor. El grupo CDNF+PQ, obtuvo resultados similares al control, ya que el CDNF al proteger las neuronas evitó que se manifestara la disfunción motora.

Las reacciones neuroinflamatorias se han descrito en prácticamente todos los casos de la EP, con varios estudios apoyando la hipótesis de que las respuestas neuroinflamatorias mediadas por microglía exacerban la pérdida de neuronas dopaminérgicas y, por tanto, empeoran los síntomas clínicos. Se ha reportado que la neurodegeneración de las neuronas dopaminérgicas en la EP, en pacientes post-mortem, está acompañada por el aumento en el número de microglía (Machado, Zöller, Attaai, & Spittau, 2016). La microglía son células fagocíticas que componen el sistema inmune innato del SNC, usualmente se encuentran en reposo, pero se

activan durante una lesión cerebral, este fenómeno es conocido como microgliosis. Sin embargo, la actividad de la microglía puede contribuir, paradójicamente, a la muerte de las neuronas (Fricke et al., 2016).

Nuestros resultados indican que el CDNF inhibe la activación de la microglía. El grupo tratado con CDNF tuvo un número de células de la microglía semejante al grupo control. El PQ incrementó la activación de la microglía, y ésta fue disminuida en el grupo CDNF+PQ. Por lo tanto, el CDNF inhibe la activación de la microglía que causa mayor neurodegeneración por producir otros agentes potencialmente tóxicos para las neuronas, debido a que es una fuente importante de superóxido y óxido nítrico, que contribuyen al estrés oxidativo en el microambiente del cerebro (Vera Dias, Eunsung Junn, 2014).

Los astrocitos son el tipo celular más común en el cerebro. Son esenciales para el metabolismo del cerebro, transporte de nutrientes y también desempeñan un papel en la neuroinflamación. La astrogliosis tiene reacción después de lesiones cerebrales, como infección, trauma y enfermedades neurodegenerativas (Cabezas et al., 2013).

La reacción de los astrocitos generalmente se considera un evento esencial en la formación de la llamada cicatriz glial o también conocido como astrogliosis. En nuestros resultados se observó este fenómeno en los grupos tratados con PQ teniendo un gran número de astrocitos, indicando que fue efectiva la lesión causada en el cerebro de estos ratones. Al contrario, en los animales del grupo CDNF+PQ no se observó un aumento de la activación de los astrocitos por el efecto neuroprotector del CDNF, mostrando semejanza con el grupo control. Regularmente este evento se relaciona con beneficios funcionales, pero bajo circunstancias especiales puede permitir efectos dañinos (Sofroniew, 2015).

El papel de los oligodendrocitos en la patología de la EP sigue sin ser claro y ha sido mayormente ignorado, solo algunos estudios han reportado alteración de oligodendrocitos en la EP. Los oligodendrocitos son células gliales multifuncionales en el SNC y desempeñan activamente papeles importantes en condiciones fisiológicas y patológicas. Una de las limitaciones para estos estudios reside en el hecho de que las fibras dopaminérgicas nigroestriales están pobremente mielinizadas. Es razonable pensar que al igual que la microglía y los astrocitos, los oligodendrocitos pueden presentar cambios de fenotipo y de expresión de proteínas después de una degeneración neuronal. Pero la poca información sobre la reacción de oligodendrocitos en la pérdida de axones dopaminérgicos en la EP, no dejan claro el significado biológico y el vínculo con la respuesta inflamatoria (Barcia, 2013).

Nuestros resultados muestran una pérdida de oligodendrocitos en el grupo PQ mientras que el grupo CDNF+PQ presentó semejanza con el control. Esta disfunción está relacionada con diversas enfermedades neurodegenerativas comunes. Por esta razón es importante enfatizar y evaluar exhaustivamente el papel de los oligodendrocitos en la restauración de los axones (Liu & Zhou, 2013).

12 Conclusiones

El complejo RVGm-KP-CDNF es eficiente como vehículo para la entrega del gen CDNF en un modelo animal de la EP.

Mediante este modelo de la EP se demostró la capacidad del CDNF para:

- A) Disminuir el daño del PQ en la vía nigroestriatal que conlleva a una disfunción motora.
- B) Disminuir el daño del PQ en la vía mesolímbica involucrada en la disfunción cognitiva.

Histológicamente demostramos que el CDNF:

- A) Protege las neuronas dopaminérgicas del daño causado por el PQ.
- B) Inhibe la proliferación de astrocitos (Astrogliosis) inducida por el PQ.
- C) Inhibe la activación de la microglía inducida por el PQ.
- D) Protege a los oligodendrocitos del daño causado por el PQ.

.

13 Bibliografía

- Alexander, G. E. (2004). Biology of Parkinson's disease: Pathogenesis and pathophysiology of a multisystem neurodegenerative disorder. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, 6(3), 259–280.
- Astray, R. M., Jorge, S. A. C., & Pereira, C. A. (2017). Rabies vaccine development by expression of recombinant viral glycoprotein. *Archives of Virology*, 162(2), 323–332. <http://doi.org/10.1007/s00705-016-3128-9>
- Austin, W., Boyd, M. (Mary A., & Austin, W. (2010). *Psychiatric & mental health nursing for Canadian practice*. Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins.
- Back, S., Peränen, J., Galli, E., Pulkila, P., Lonka-Nevalaita, L., Tamminen, T., ... Tuominen, R. K. (2013). Gene therapy with AAV2-CDNF provides functional benefits in a rat model of Parkinson's disease. *Brain and Behavior*, 3(2), 75–88. <http://doi.org/10.1002/brb3.117>
- Barcia, C. (2013). Glial-mediated inflammation underlying parkinsonism. *Scientifica*, 2013, 357805. <http://doi.org/10.1155/2013/357805>
- Bartus, R. T., & Johnson, E. M. (2017a). Clinical tests of neurotrophic factors for human neurodegenerative diseases, part 1: Where have we been and what have we learned? *Neurobiology of Disease*, 97(July), 156–168. <http://doi.org/10.1016/j.nbd.2016.03.027>
- Bartus, R. T., & Johnson, E. M. (2017b). Clinical tests of neurotrophic factors for human neurodegenerative diseases, part 2: Where do we stand and where must we go next? *Neurobiology of Disease*, 97(July), 169–178. <http://doi.org/10.1016/j.nbd.2016.03.026>
- Bowers, W. J., Breakefield, X. O., & Sena-Esteves, M. (2011). Genetic therapy for the nervous system. *Human Molecular Genetics*, 20. <http://doi.org/10.1093/hmg/ddr110>
- Cabezas, R., Fidel, M., Torrente, D., Santos El-Bach, R., Morales, L., Gonzalez, J., & E., G. (2013). Astrocytes Role in Parkinson: A Double-Edged Sword. In *Neurodegenerative Diseases*. InTech. <http://doi.org/10.5772/54305>
- Capoccia, S., Maccarinelli, F., Buffoli, B., Rodella, L. F., Cremona, O., Arosio, P., & Cirulli, F. (2015). Behavioral characterization of mouse models of neuroferritinopathy. *PLoS ONE*, 10(2), 1–15. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0118990>
- Collas, P., & Aleström, P. (1997). Nuclear localization signals: a driving force for nuclear transport of plasmid DNA in zebrafish. *Biochemistry and Cell Biology = Biochimie et Biologie Cellulaire*, 75(5), 633–40. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9551185>

- da Cruz, M. T. G., Cardoso, A. L. C., de Almeida, L. P., Simões, S., & de Lima, M. C. P. (2005). Tf-lipoplex-mediated NGF gene transfer to the CNS: neuronal protection and recovery in an excitotoxic model of brain injury. *Gene Therapy*, 12(16), 1242–1252. <http://doi.org/10.1038/sj.gt.3302516>
- Dawson, T. M., & Valina, L. (2003). Molecular Pathways of Neurodegeneration in Parkinson's Disease, 302(October), 819–823.
- Day, B. J., Patel, M., Calavetta, L., Chang, L. Y., & Stamler, J. S. (1999). A mechanism of paraquat toxicity involving nitric oxide synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(22), 12760–5. <http://doi.org/10.1073/pnas.96.22.12760>
- De Angelis, F., Bernardo, A., Magnaghi, V., Minghetti, L., & Tata, A. M. (2012). Muscarinic receptor subtypes as potential targets to modulate oligodendrocyte progenitor survival, proliferation, and differentiation. *Developmental Neurobiology*, 72(5), 713–728. <http://doi.org/10.1002/dneu.20976>
- DEAN, D. J., EVANS, W. M., & MCCLURE, R. C. (1963). PATHOGENESIS OF RABIES. *Bulletin of the World Health Organization*, 29, 803–811. http://doi.org/10.1007/3-540-27485-5_3
- Emerit, J., Edeas, M., & Bricaire, F. (2004). Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 58(1), 39–46. <http://doi.org/10.1016/j.biopha.2003.11.004>
- Fricke, I. B., Viel, T., Worlitzer, M. M., Collmann, F. M., Vrachimis, A., Faust, A., ... Jacobs, A. H. (2016). 6-hydroxydopamine-induced Parkinson's disease-like degeneration generates acute microgliosis and astrogliosis in the nigrostriatal system but no bioluminescence imaging-detectable alteration in adult neurogenesis. *European Journal of Neuroscience*, 43(10), 1352–1365. <http://doi.org/10.1111/ejn.13232>
- Fu, A., Zhang, M., Gao, F., Xu, X., & Chen, Z. (2013). A Novel Peptide Delivers Plasmids across Blood-Brain Barrier into Neuronal Cells as a Single-Component Transfer Vector. *PLoS ONE*, 8(3), 1–9. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0059642>
- Girirajan, S., Patel, N., Slager, R. E., Tokarz, M. E., Bucan, M., Wiley, J. L., & Elsea, S. H. (2008). How much is too much? Phenotypic consequences of Rai1 overexpression in mice. *European Journal of Human Genetics : EJHG*, 16(8), 941–954. <http://doi.org/10.1038/ejhg.2008.21>
- Gray, S. J., Woodard, K. T., & Samulski, R. J. (2010). Viral vectors and delivery strategies for CNS gene therapy. *Therapeutic Delivery*, 1(4), 517–34. <http://doi.org/10.4155/tde.10.50>
- Harris, R. A., & Jenner, P. (2012). *Neurobiology*. (R. Adron Harris & P. Jenner, Eds.) (First Edit, Vol. 102). Amsterdam: Editorial BOARD.

- Herce, H. D., Garcia, A. E., Litt, J., Kane, R. S., Martin, P., Enrique, N., ... Milesi, V. (2009). Arginine-rich peptides destabilize the plasma membrane, consistent with a pore formation translocation mechanism of cell-penetrating peptides. *Biophysical Journal*, 97(7), 1917–1925. <http://doi.org/10.1016/j.bpj.2009.05.066>
- Hess, S. E., Rohr, S., Dufour, B. D., Gaskill, B. N., Pajor, E. A., & Garner, J. P. (2008). Home improvement: C57BL/6J mice given more naturalistic nesting materials build better nests. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, 47(6), 25–31. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2687128&tool=pmc&rendertype=abstract>
- Hetze, S., Römer, C., Teufelhart, C., Meisel, A., & Engel, O. (2012). Gait analysis as a method for assessing neurological outcome in a mouse model of stroke. *Journal of Neuroscience Methods*, 206(1), 7–14. <http://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2012.02.001>
- Huang, Y. W., Lee, H. J., Tolliver, L. M., & Aronstam, R. S. (2015). Delivery of nucleic acids and nanomaterials by cell-penetrating peptides: Opportunities and challenges. *BioMed Research International*, 2015, 11–13. <http://doi.org/10.1155/2015/834079>
- Huey, R., & Hawthorne, S. (2016). The potential use of rabies virus glycoprotein-derived peptides to facilitate drug delivery into the central nervous system: a mini review. *Journal of Drug Targeting*, 2330(September), 1–7. <http://doi.org/10.1080/1061186X.2016.1223676>
- Kirchhoff, J., Mörk, A., Brennum, L. T., & Sager, T. N. (2009). Striatal extracellular dopamine levels and behavioural reversal in Mptp-lesioned mice. *Neuroreport*, 20(5), 482–486. <http://doi.org/10.1097/WNR.0B013E32832984D6>
- Kotzbauer, P. T., & Holtzman, D. M. (2006). Expectations and challenges in the therapeutic use of neurotrophic factors. *Annals of Neurology*, 59(3), 444–447. <http://doi.org/10.1002/ana.20794>
- Kristensen, M., Birch, D., & Nielsen, H. M. (2016). Applications and challenges for use of cell-penetrating peptides as delivery vectors for peptide and protein cargos. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(2). <http://doi.org/10.3390/ijms17020185>
- Kumar, P., Wu, H., McBride, J. L., Jung, K.-E., Kim, M. H., Davidson, B. L., ... Manjunath, N. (2007). Transvascular delivery of small interfering RNA to the central nervous system. *Nature*, 448(7149), 39–43. <http://doi.org/10.1038/nature05901>
- Lentz, T., Burrage, T., Smith, A., Crick, J., & Tignor, G. (1982). Is the acetylcholine receptor a rabies virus receptor? *Science*, 215(4529). Retrieved from <http://science.sciencemag.org/content/215/4529/182.long>

- Lindholm, P., Voutilainen, M. H., Laurén, J., Peränen, J., Leppänen, V.-M., Andressoo, J.-O., ... Saarma, M. (2007). Novel neurotrophic factor CDNF protects and rescues midbrain dopamine neurons in vivo. *Nature*, 448(7149), 73–77. <http://doi.org/10.1038/nature05957>
- Liu, Y., & Zhou, J. (2013). Oligodendrocytes in neurodegenerative diseases. *Frontiers in Biology*, 8(2), 127–133. <http://doi.org/10.1007/s11515-013-1260-4>
- Lo Bianco, C., Déglon, N., Pralong, W., & Aebischer, P. (2004). Lentiviral nigral delivery of GDNF does not prevent neurodegeneration in a genetic rat model of Parkinson's disease. *Neurobiology of Disease*, 17(2), 283–289. <http://doi.org/10.1016/j.nbd.2004.06.008>
- Machado, V., Zöller, T., Attaai, A., & Spittau, B. (2016). Microglia-mediated neuroinflammation and neurotrophic factor-induced protection in the MPTP mouse model of parkinson's disease-lessons from transgenic mice. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(2), 1–24. <http://doi.org/10.3390/ijms17020151>
- Marks, W. J., Ostrem, J. L., Verhagen, L., Starr, P. A., Larson, P. S., Bakay, R. A., ... Bartus, R. T. (2008). Safety and tolerability of intraputamin delivery of CERE-120 (adeno-associated virus serotype 2-neurturin) to patients with idiopathic Parkinson's disease: an open-label, phase I trial. *The Lancet Neurology*, 7(5), 400–408. [http://doi.org/10.1016/S1474-4422\(08\)70065-6](http://doi.org/10.1016/S1474-4422(08)70065-6)
- Mätlik, K., Vihinen, H., Bienemann, A., Palgi, J., Voutilainen, M. H., Booms, S., ... Arumäe, U. (2017). Intrastratially Infused Exogenous CDNF Is Endocytosed and Retrogradely Transported to Substantia Nigra. *Eneuro*, 4(1), ENEURO.0128-16.2017. <http://doi.org/10.1523/ENEURO.0128-16.2017>
- Meredith, G. E., & Rademacher, D. J. (2012). MPTP Mouse Models of Parkinson's Disease: An Update. *J Parkinsons Dis*, 1(1), 19–33. <http://doi.org/10.3233/JPD-2011-11023>
- Misra, A. (2011). *Challenges in Delivery of Therapeutic Genomics and Proteomics*. (A. Misra, Ed.), *Challenges in Delivery of Therapeutic Genomics and Proteomics* (First edit). Vadora: Elsevier. <http://doi.org/10.1016/C2010-0-65663-X>
- Money, K. M., & Stanwood, G. D. (2013). Developmental origins of brain disorders: roles for dopamine. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 7(December), 260. <http://doi.org/10.3389/fncel.2013.00260>
- Moore, D., & Puri, B. (2012). *Textbook of clinical neuropsychiatry and behavioral neuroscience*. Hodder Education.
- Nadella, R., Voutilainen, M. H., Saarma, M., Gonzalez-Barrios, J. A., Leon-Chavez, B. A., Jiménez, J. M. D., ... Martinez-Fong, D. (2014). Transient transfection of human CDNF gene reduces the 6-hydroxydopamine-induced

- neuroinflammation in the rat substantia nigra. *Journal of Neuroinflammation*, 11, 209. <http://doi.org/10.1186/s12974-014-0209-0>
- Norisada, J., Hirata, Y., Amaya, F., Kiuchi, K., & Oh-Hashi, K. (2016). A comparative analysis of the molecular features of MANF and CDFN. *PLoS ONE*, 11(1). <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0146923>
- O'Connor, D. M., & Boulis, N. M. (2015). Gene therapy for neurodegenerative diseases. *Trends in Molecular Medicine*, 21(8), 504–512. <http://doi.org/10.1016/j.molmed.2015.06.001>
- Pérez-Martínez, F. C., Guerra, J., Posadas, I., & Ceña, V. (2011). Barriers to non-viral vector-mediated gene delivery in the nervous system. *Pharmaceutical Research*, 28(8), 1843–58. <http://doi.org/10.1007/s11095-010-0364-7>
- Pulmanausahakul, R., Li, J., Schnell, M. J., & Dietzschold, B. (2008). The Glycoprotein and the Matrix Protein of Rabies Virus Affect Pathogenicity by Regulating Viral Replication and Facilitating Cell-to-Cell Spread. *JOURNAL OF VIROLOGY*, 82(5), 2330–2338. <http://doi.org/10.1128/JVI.02327-07>
- Ramirez Moreno, M. (2016). Analisis del efecto de la inducción de autofagia en un modelo animal de la enfermedad de Parkinson. Tesis de Maestria. Universidad Autonoma de Nuevo León. Monterrey, México.
- Ren, X., Zhang, T., Gong, X., Hu, G., Ding, W., & Wang, X. (2013). AAV2-mediated striatum delivery of human CDFN prevents the deterioration of midbrain dopamine neurons in a 6-hydroxydopamine induced parkinsonian rat model. *Experimental Neurology*, 248, 148–156. <http://doi.org/10.1016/j.expneurol.2013.06.002>
- Rodriguez-Rocha, H., Garcia Garcia, A., Zavala-Flores, L., Li, S., Madayiputhiya, N., & Franco, R. (2012). Glutaredoxin 1 protects dopaminergic cells by increased protein glutathionylation in experimental Parkinson's disease. *Antioxidants & Redox Signaling*, 17(12), 1676–93. <http://doi.org/10.1089/ars.2011.4474>
- Ross, B. A., Favi, C. M., & Vasquez, V. A. (2008). Glicoproteína del virus rábico: Estructura, inmunogenicidad y rol en la patogenia. *Artículo Especial*, 25, 5. <http://doi.org/10.4067/S0716-10182008000200016>
- Salman, H., Abu-Arish, A., Oliel, S., Loyter, A., Klafter, J., Granek, R., & Elbaum, M. (2005). Nuclear localization signal peptides induce molecular delivery along microtubules. *Biophysical Journal*, 89(3), 2134–45. <http://doi.org/10.1529/biophysj.105.060160>
- Sanders, L. H., & Greenamyre, J. T. (2013). Oxidative damage to macromolecules in human Parkinson disease and the rotenone model. *Free Radical Biology & Medicine*, 62, 111–20. <http://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.01.003>
- Schnell, M. J., McGettigan, J. P., Wirblich, C., & Papaneri, A. (2009). The cell

- biology of rabies virus: using stealth to reach the brain. *Nature Reviews Microbiology*, 8(jANuARy). <http://doi.org/10.1038/nrmicro2260>
- Shimizu, K., Ohtaki, K., Matsubara, K., Aoyama, K., Uezono, T., Saito, O., ... Shiono, H. (2001). Carrier-mediated processes in blood–brain barrier penetration and neural uptake of paraquat. *Brain Research*, 906, 135–142. Retrieved from www.elsevier.com
- Sofroniew, M. V. (2015). Astrogliosis. *Cold Spring Harb Perspect Biology*. <http://doi.org/10.1101/cshperspect.a020420>
- SPINA, M. B., & HYMAN, CAROLYN, E. al. (1992). Brain-Derived Neurotrophic Factor Protects Dopaminergic Cells from 6-Hydroxydopamine Toxicity. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 648(1 Neurotoxins a), 348–350.
- Stalmans, S., Bracke, N., Wynendaele, E., Gevaert, B., Peremans, K., Burvenich, C., ... De Spiegeleer, B. (2015). Cell-penetrating peptides selectively cross the blood-brain barrier in vivo. *PLoS ONE*, 10(10), 1–22. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0139652>
- Sullivan, A. M., & O’Keeffe, G. W. (2016). Neurotrophic factor therapy for Parkinson ’ s disease : past , present and future. *Neural Regeneration Research*, 11(2), 205–207. <http://doi.org/10.4103/1673-5374.177710>
- Tao, F., & Johns, R. A. (2010). Tat-Mediated Peptide Intervention in Analgesia and Anesthesia. *Drug Development Research*, 71(2), 99–105. <http://doi.org/10.1002/ddr.20331>
- Tashima, T. (2017). Intelligent substance delivery into cells using cell-penetrating peptides. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 27(2), 121–130. <http://doi.org/10.1016/j.bmcl.2016.11.083>
- Tepper, J. M., & Lee, C. R. (2007). GABAergic control of substantia nigra dopaminergic neurons. In *Progress in brain research* (Vol. 160, pp. 189–208). [http://doi.org/10.1016/S0079-6123\(06\)60011-3](http://doi.org/10.1016/S0079-6123(06)60011-3)
- Thoenen, H., & Tranzer, J. P. (1968). [On the possibility of chemical sympathectomy by selective destruction of adrenergic nerve endings with 6-hydroxydopamine (6-OH-DA)]. *Naunyn-Schmiedeberg's Archiv Fur Experimentelle Pathologie Und Pharmacologie*, 260(2), 212–3. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4239240>
- Tieu, K. (2011). A guide to neurotoxic animal models of Parkinson’s disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 1(1), a009316. <http://doi.org/10.1101/cshperspect.a009316>
- Vera Dias, Eunsung Junn, M. M. M. (2014). The Role of Oxidative Stress in Parkinson’s Disease. *J Parkinsons Dis*, 3(4), 461–491. <http://doi.org/10.3233/JPD-130230>.The

- Villa-Cedillo, S. A., Rodríguez-Rocha, H., Zavala-Flores, L. M., Montes-de-Oca-Luna, R., García-García, A., Loera-Arias, M. d. J., & Saucedo-Cárdenas, O. (2017). Asn194Lys mutation in RVG29 peptide increases GFP transgene delivery by endocytosis to neuroblastoma and astrocyte cells. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 1–12. <http://doi.org/10.1111/jphp.12766>
- Voutilainen, M. H., Bäck, S., Pörsti, E., Toppinen, L., Lindgren, L., Lindholm, P., ... Tuominen, R. K. (2009). Mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor is neurorestorative in rat model of Parkinson's disease. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 29(30), 9651–9659. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0833-09.2009>
- Weissmiller, A. M., & Wu, C. (2012). Current advances in using neurotrophic factors to treat neurodegenerative disorders. *Translational Neurodegeneration*, 1(1), 14. <http://doi.org/10.1186/2047-9158-1-14>
- Wirdefeldt, K., Adami, H.-O., Cole, P., Trichopoulos, D., & Mandel, J. (2011). Epidemiology and etiology of Parkinson's disease: a review of the evidence. *Eur J Epidemiol*, 26, 1–58. <http://doi.org/10.1007/s10654-011-9581-6>
- Wirdefeldt, K., Adami, H.-O., Cole, P., Trichopoulos, D., Mandel, J., Wirdefeldt, K., ... Mandel, J. (2011). Epidemiology and etiology of Parkinson's disease: a review of the evidence. *Eur J Epidemiol*, 26, 1–58. <http://doi.org/10.1007/s10654-011-9581-6>
- Wu, S. P., Fu, A. L., Wang, Y. X., Yu, L. P., Jia, P. Y., Li, Q., ... Sun, M. J. (2006). A novel therapeutic approach to 6-OHDA-induced Parkinson's disease in rats via supplementation of PTD-conjugated tyrosine hydroxylase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 346(1), 1–6. <http://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.03.247>

14 Anexos

Created with SnapGene®

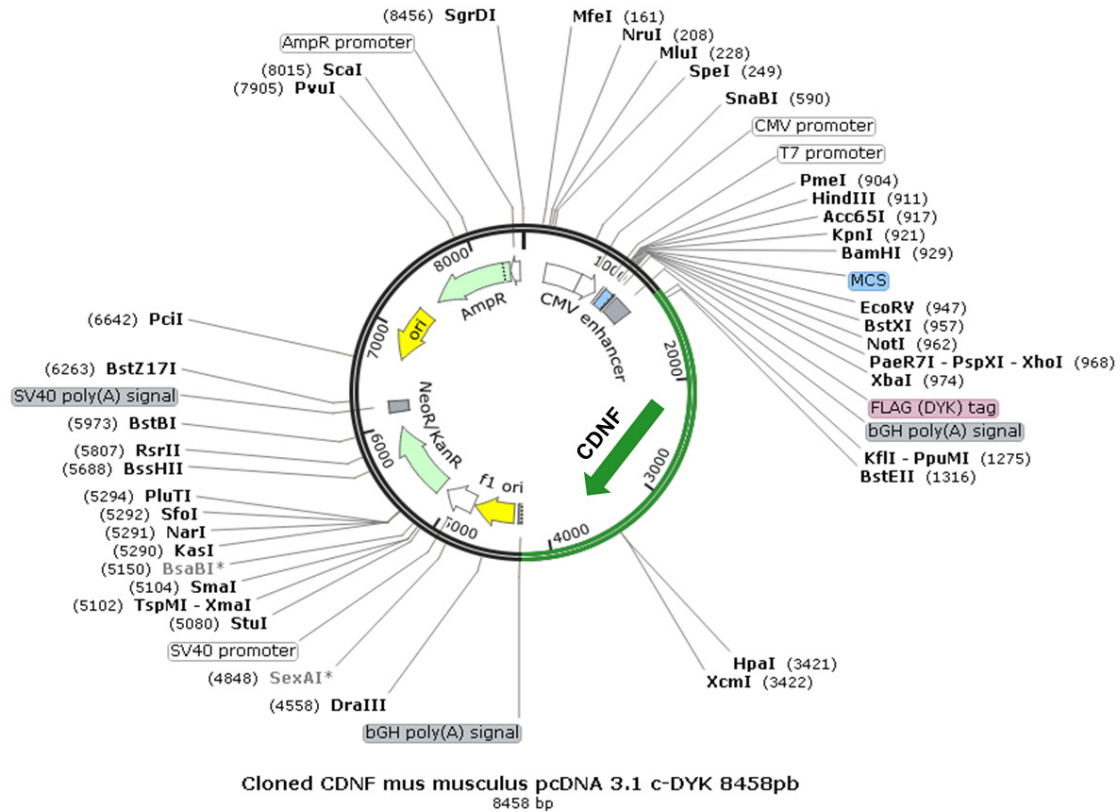


Figura 16. Plásmido de expresión del gen CDNF.

Vector de expresión pcDNA 3.1, al cual se le insertó el gen CDNF para su expresión. En este mapa se pueden apreciar todos los sitios de restricción.

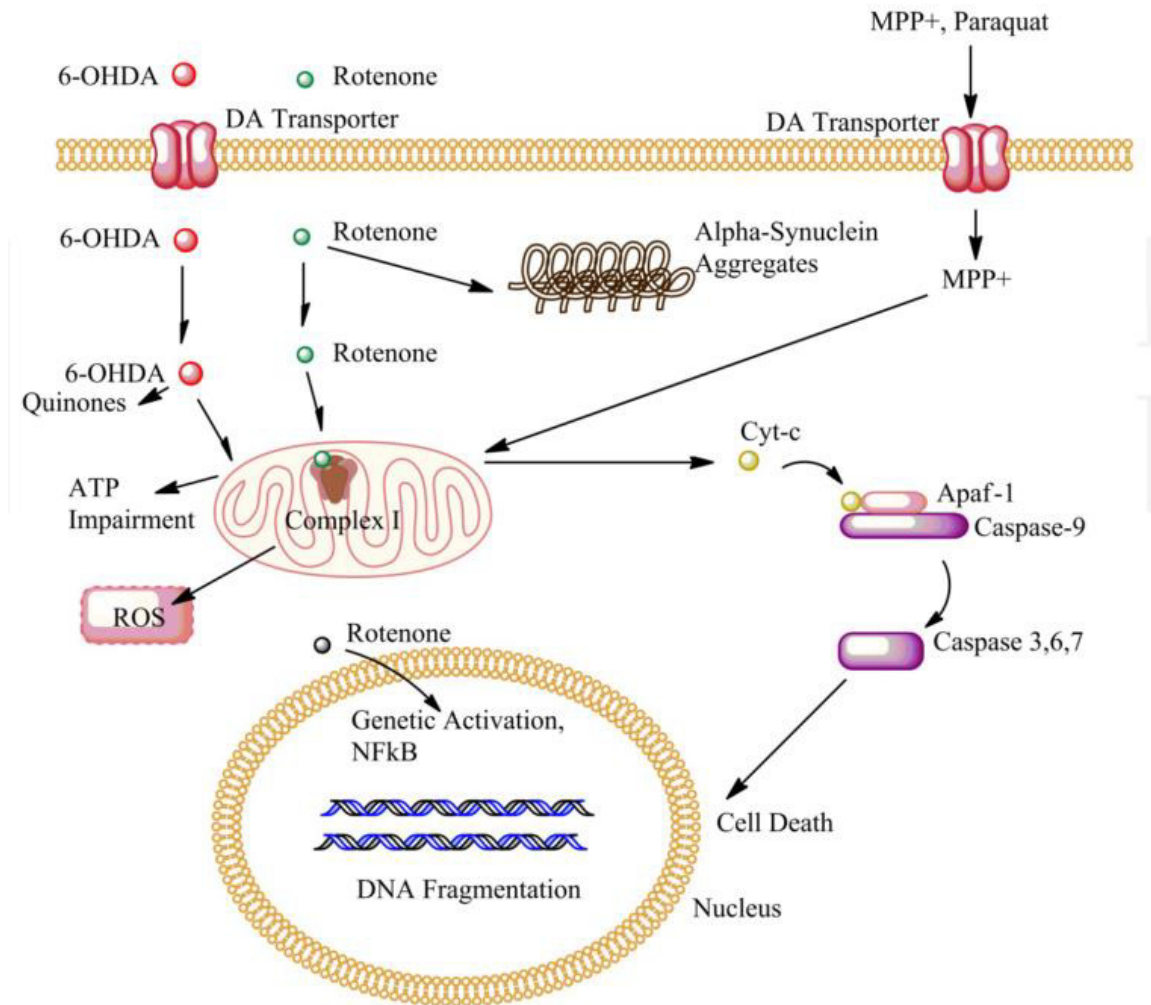


Figura 17. Modelos experimentales de la enfermedad de Parkinson

Esquema representativo de moléculas que se usan actualmente en modelos celulares y animales de la EP, incluyendo pesticidas como paraquat o rotenona y neurotoxinas como 6-OHDA y MPP⁺. La 6-OHDA que es un análogo de la dopamina; el MPTP es lipofílico con capacidad de atravesar la BHE y es metabolizado por los astrocitos hasta convertirlo en MPP⁺ que es el inhibidor del complejo I mitocondrial. La rotenona que funciona de la misma manera que el MPP⁺, como inhibidor del complejo I mitocondrial; y el paraquat que presenta la capacidad de atravesar la BHE produciendo principalmente toxicidad a la mitocondria mediante el ciclo redox por la generación de ROS. El paraquat causa generación de ROS y la liberación de moléculas pro-apoptóticas, que inducen la apoptosis (Cabezas et al., 2013).